

**VICTOR BABEȘ UNIVERSITY OF MEDICINE  
AND PHARMACY FROM TIMIȘOARA  
FACULTY OF MEDICINE  
DEPARTMENT II – MICROSCOPIC MORFOLOGY  
/HISTOLOGY**

**JITIAN CRISTINA-RALUCA**



# **PHD THESIS**

**PHENOTYPIC AND MOLECULAR ASPECTS IN ATYPICAL NEVI  
AND MELANOMA**

## **A B S T R A C T**

**Scientific Coordinator:**

**PROF. RAICA MARIUS, MD PhD**

**Timișoara**

**2025**

## INTRODUCTION

Melanoma is one of the neoplasms with the greatest genetic instability, frequently affecting the genes involved in: cell proliferation (BRAF, NRAS, NF1), cell metabolism and growth (PTEN, KIT), cell identity (ARID2), resistance to apoptosis (TP53), cell cycle control (CDKN2A), and cell life span (TERT). These mutations mainly relate to the patient's age and carcinogenic exposure (ultraviolet radiation). The diagnosis of melanoma is most often established based on the standard diagnostic methods (dermoscopy, histopathological examination). Still, some techniques can identify genetic mutations in melanocytic structures, for example hybridization techniques (FISH, CISH, CGH), etc.

The doctoral thesis consists of an **introductory part**, a **general part** in which theoretical information about benign and malignant melanocytic tumors (melanoma) is presented, and a **special part** in which the research carried out in this study is presented. Thus, the **special part** of the thesis is structured into four main studies: **Study 1: Mast cells stimulate angiogenesis in the early stages of tumors - multicenter study.** **Study 2: Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) in Melanoma Diagnosis: Pros and Cons.** **Study 3: Phenotypic aspects of melanocytic tumors. Standard diagnostic methods in nevi and melanoma (Study 3.1: Similarities between atypical nevi and melanoma, Study 3.2: The utility of dermoscopy as a diagnostic method for melanocytic tumors).** **Study 4: The main causes of melanoma onset. Nevogenesis versus melanomagenesis.**

The *purpose*, *main/secondary objectives*, *research methods*, *results* obtained, and *discussions* are detailed within each study listed above. **Study 1** is composed of standard research and contains a review regarding the relationship between the tumor microenvironment and melanoma. The next two studies (**Study 2 and 3**) also contain standard research, demonstrating the usefulness of standard and modern diagnostic techniques in melanoma, presenting the relationship between nevi and melanoma, and testing various dermoscopic algorithms and diagnostic techniques (FISH). **Study 4** represents a review of the most important information in the literature concerning the causes of melanoma. Regarding the **research methodology**, the thesis focused on the tumors included in the study, obtaining relevant results similar to those found in the literature. Towards the end of the thesis, one can see the **conclusions** and **personal contributions** related to this study, the **bibliography**, and the **annexes**.

**Motivation for choosing the thesis's theme:** Melanoma is an aggressive neoplasm whose mechanisms of action and causes of development are not fully known. Understanding the biology of melanoma could be useful in improving patients' prognosis and developing new methods of diagnosis and treatment. *Objectives* - analysis of the phenotypic and molecular aspects identified in common, atypical, and malignant melanocytic lesions in the group proposed for study, to understand melanoma's mode of action and the relationship between nevi and melanomas. Also, we tested some diagnostic methods rarely used in Romania, namely fluorescence in situ hybridization, to determine their effectiveness (pros and cons).

**The importance of the research's topic:** the importance and timeliness of this research lie in the need to improve melanoma diagnosis, particularly through novel techniques such as FISH, which have not been extensively used in Romania. The findings contribute to a better understanding of melanoma pathogenesis and may aid in developing improved diagnostic protocols. The thesis and all its studies align with international and national efforts to improve melanoma diagnosis and prognosis. It is desired to continue the study on the causes of melanoma, to analyze the importance of molecular techniques in diagnosing melanoma.

## THE GENERAL PART

Melanocytes are highly specialized cells that synthesize and distribute melanin, a pigment known for its role in skin, hair, eyes, and inner ear. Approximately 128 genes are involved in skin pigmentation, which ensures this process through a complex mechanism. The disruption of the functions of these genes can cause the appearance of pigmentary pathologies, affecting the development (specification, migration, survival, proliferation), and differentiation of melanocytes.

**Melanocytic nevi** are benign tumors, and among the main types of nevi are:

- **Congenital nevi (CMN):** present at birth or between the ages of 1 month and 2 years. Frequently located on the trunk and extremities, rarely on the scalp and face area. *Clinically*, most are in the form of brown macules/plaques with sharp or slightly irregular edges, with hypertrichosis (in most cases), having a regular pigmentation initially, evolving with variability in texture and color. *Dermatoscopically*, they can have a reticular, globular, homogeneous, "paving stone" pattern (large and polygonal globules) or mixed, with variable pigmentation and structure in some nevi, and can even have an atypical clinical appearance (polychromy, irregular contour, regression phenomena). *Histopathologically*, they may be junctional, intradermal, or compound; they may present mild/moderate cytological or architectural atypia and pagetoid dispersion. Large and giant congenital nevi have a higher *risk of transformation into melanoma*. These nevi result from *postzygotic somatic mutations* of various proteins involved in the MAPK (mitogen-activated protein kinase pathway) pathway, in embryonic melanocytes.
- **Acquired common nevi:** pigmented/skin-colored macules with a uniform appearance, small (< 6 mm diameter), symmetrical, round-oval, +/- hypertrichosis, with well-defined edges. They develop during childhood or in adulthood. They can be located in any anatomical area, including on the palms/soles and the nail apparatus. *Dermatoscopically*, depending on the location, they may have a reticular/globular pattern (acral located nevi have a specific dermoscopic pattern), normally pigmented network, limited colors, and they may regress. *Histopathological: junctional* (at the level of the epidermis), dermal or compound (with localization in the dermis and epidermis); junctional nevi have a circumscribed appearance, with melanocytic nests in the basal layer, pale/pigmented cytoplasm, with small, monomorphic nuclei, hyperpigmented epidermis with lentiginous architecture. *Compound nevi* – normal/hyperplastic epidermis, with large epithelioid cells in the superficial dermis, and small, fusiform cells in the deep dermis. *The risk of transformation into melanoma* increases with the number of nevi, melanoma developed on pre-existing nevi being identified in a variable percentage, on average 30%. Among *the genetic mutations* found in acquired nevi are the mutations of the following genes: BRAF, NRAS, HRAS, HLA-CW6 (Halo nevi), FGFR3, PIK3CA, MITF (a key factor in melanin production), endothelin BRp/1 (role in melanogenesis), T1799A, BRAF (lentigine after PUVA therapy).

### Elements suggesting the transformation of a nevus into melanoma:

1. Changes in the shape/size/color of a pre-existing nevus (the ABCDE *rule*, where A = asymmetry, B = irregular contour, C = polychromy, D = diameter ≥6mm, E = evolution) or the appearance of a new melanocytic lesion that has different characteristics from the rest of the nevi – *the ugly duckling sign*,
2. Erythematous halo (*inflammation*) around a pre-existing nevus,
3. *Itching, tenderness, pain*,
4. Change in the surface/texture of the nevus, with exudate, crusts, *bleeding, ulceration*, or the appearance of nodules.

**Atypical nevi** are structures with an atypical architectural and cytological appearance commonly found in Caucasians. They appear "de novo" or as part of a pre-existing melanocytic nevus, sporadic (prevalence 2-8% in Caucasians), or in the context of atypical nevus syndrome (AMS).

**Clinically, atypical nevi differ from common nevi in the following aspects:**

1. diameter > 6 mm,
2. irregular contour, imprecise edges,
3. variable pigmentation (from brown to pink-red),
4. asymmetrical,
5. smooth texture or paving stone appearance,
6. they can persist/involute.

They can be located both on photoexposed areas (especially those intermittently exposed to UV radiation, frequently on the trunk) and unexposed areas – on the buttocks/genital area, etc. The etiology of atypical nevi is unclear, but their phenotypic expression seems related to environmental and genetic factors (light skin, photosensitivity, etc.). **Biologically**, a series of mutations can be found in atypical nevi, namely: BCL1 (Cyclin D1), CDK6, XRCC1, BRAF, loss of PTEN expression, alteration of P53 expression, CDKN2A – p16INK4a and p14ARF (in 40% of cases in atypical nevus syndrome), chromosomal instability (1p, 9p).

**Diagnosing** atypical nevi and the differentiation of melanoma is performed through clinical-paraclinical examinations (dermoscopy, histopathology/immunohistochemistry), and molecular techniques (FISH, CGH) - in case of ambiguity in the histopathological examination. *Histopathologically*, an intraepidermal melanocytic lentiginous hyperplasia is observed, with abundant cytoplasm, nuclear pleomorphism, large, atypical nuclei, horizontally oriented cell nests with variable sizes, performing anastomoses with adjacent ridges, cytological and architectural atypia, typical being the phenomenon of "shouldering" – the extension of the junctional component of the nevus beyond the intradermal component. Atypical nevi with severe dysplasia have an increased risk of melanoma and may be difficult to distinguish from melanoma in its early stages, but prophylactic excision of the nevi is not indicated, as most melanomas develop "de novo". *Management of atypical nevi* - it is recommended to perform the excision of an atypical nevus when at least one of the following criteria is identified: gray/blue structures, eccentric hyperpigmented areas, striae/reticular/branched lines, peripheral dots/black blood cells, segmental radial/pseudopod lines, white lines, polymorphic vessels, angular lines (polygons).

Melanoma develops through genetic, epigenetic, and allogeneic changes in melanocytes. About 26 years ago, Clark et al. (1984) reported that there could be a linear model of melanoma development, suggesting that nevi would progress to atypical nevi, melanoma, and eventually metastatic melanoma. Various cytogenetic analyses of melanocyte lesions, confirmed by molecular techniques, show a progression of nevi to melanoma, then to metastasis, with gene mutations/factors of critical importance in this process.

**Genes/factors involved in melanoma:** *CDKN2A locus (9p21)* (specific to FAMMM syndrome/familial melanoma syndrome); *TP53* (found in 25-58% of melanomas; *PTEN-AKT pathway (10q24)* – role in cell proliferation and survival; *PTEN deletion* (in 28% of melanoma cell lines, in 7% of primary melanomas and in 15% of metastatic melanomas); *BRAF gene* - the most common is *BRAFV600* found in over 90% of melanomas; *RAS/NRAS* (in 15-25% of melanomas); *the NRAS-BRAF-MEK-ERK (MAP kinase) pathway*—great importance in melanoma genesis; *the MET gene* (found in metastatic melanoma); *KIT*: mutation in melanomas occurring on areas affected by ultraviolet radiation (photoexposed); *NEDD9* (its mutation gives melanocytes the ability to invade and metastasize); other/other genes/transcription factors: *RTK, PTPRD, MITF, TBX2, MYC, miRNAs, etc.* – role in tumorigenesis. Once malignantly transformed, melanocytes proliferate autonomously, resisting differentiation and growth inhibition signals.

**The main risk factors for melanoma are** (influenced by a pre-existing genetic terrain that determines certain photosensitivity of the patient):

**-Ultraviolet radiation:** carcinogenic factor, especially in the case of intermittent, cumulative (chronic) exposure. Sun exposure and **genetic factors** are the most important in triggering melanoma. The same risk includes exposure to artificial light – psoralen + UVA (PUVA), UVB (artificial tan). The explanation for the appearance of melanoma following the action of UV radiation is given by the fact that it has a carcinogenic, inflammatory, immunosuppressive effect on cellular DNA, contributing to the initiation, progression, and even metastasis of melanoma. UVB (280-320 nm) directly affects cellular DNA, and UVA (320-400 nm) produces oxygen-free reagents (ROS).

**-Skin phenotype:** fair skin, blonde or reddish hair, green or blue eyes, freckles, and a tendency to sunburn (skin phototype I-II) are phenotypic aspects associated with an increased risk of melanoma, which develops less often in people with skin phototype V-VI, suggesting that skin pigment plays a protective role.

**-Personal/family history of melanoma:** Familial melanoma refers to families in which two or more first-degree relatives have melanoma. This type of neoplasm can be acquired genetically, with the risk of transmission from generation to generation. Different genes are responsible for the appearance of familial melanoma, namely: CDKN2A—in 40% of cases (chromosome 9p21 mutations), CDK4, POT1, and TERT.

**-Other factors:** skin phototype (I, II) – light-skinned individuals have an increased risk of melanoma; high number of nevi, vitamin D deficiency, presence of atypical nevi; chronic inflammation; family history of melanoma; immunodepression; smoking/alcohol; stress.

Clinically, the main **subtypes of cutaneous melanoma** are:

**-Superficial spreading melanoma (SSM):** the most common (70%). Diagnosed more frequently on anatomical areas intermittently exposed to UV radiation. The clinical aspect falls within the ABCDE rule (asymmetry, irregular contour, color variability, diameter over 5 mm, evolution). It most often occurs on pre-existing nevi (nevus-associated melanoma – NAM). It develops over a few months/years. The most frequently encountered mutation is the BRAF mutation.

**-Nodular melanoma (NM):** the second most common subtype (15-30%), the trunk being the most affected anatomical area. This type of melanoma is more aggressive, with rapid, vertical growth. Typically, it occurs more frequently "de novo". Clinically, it is a bluish-black, pink-red, or bluish-red lesion, with 5% of the lesions being **achromic (amelanotic melanoma)**. Initially, it can be symmetrical, with regular contour and uniform color, then it changes. The ABCDE algorithm cannot identify it, but by the help of EFG (elevated-node elevated, firm, growing) and other algorithms. Commonly encountered is the BRAF mutation.

**-Lentigo malignant (LM) and lentigo malignant melanoma (LMM):** LM is a form of melanoma in situ with a prolonged radial growth phase, which over time becomes invasive, developing lentigo maligna melanoma (LMM). Frequently diagnosed around the age of 60-70, rarely under 40, the most common location is on areas chronically exposed to the sun. Clinically, they are flat lesions that enlarge slowly, brown macules with an irregular shape and different shades of brown on the surface. The mutations frequently found in this type of melanoma are: c-KIT (28%), and BRAF (6%).

**-Acral lentiginous melanoma (ALM):** common in African Americans, with an average age of 65 years, with frequent localization in the soles, palms, and nails. Clinically, at the palmo-plantar level, it has colors from brown to black, it can also have an irregular contour. A specific sign of nail melanoma is Hutchinson's sign-melanin pigment at the level of the proximal nail fold. The mutations commonly found in this subtype are: BRAF (21%), and c-KIT (13%).

Early diagnosis is the key to a good prognosis. Once discovered in its initial stages (melanoma in situ), melanoma can be cured by surgical treatment. Changes in color and size are the most common signs that can help differentiate between a common nevus and melanoma.

**Clinical examination:** necessary to be carried out in natural light, through a careful examination of the entire skin surface, but also of the mucous membranes. The clinical diagnosis of melanoma can be established in 80-90% of cases, using the ABCDE rule.

**Dermoscopy:** it helps to visualize the structures and colors of the lesions, aspects that are not visible to the naked eye. Some specific aspects of melanoma, from a **dermatoscopic point of view** are:

1. **Atypical pigmented network** – black/brown/gray in color, with irregular holes, thick lines irregularly distributed that end abruptly at the periphery,
2. **Dark black/brown irregular pigment areas (blotches)**, without structures or with discrete structures located non-centrally,
3. **Atypical dots/globules** – black, brown, round or oval, of different sizes, irregularly distributed,
4. **Irregular striae/pseudopods** – of varying colors from light brown to dark brown, starting from the center, irregularly distributed,
5. **Regression** – white, pseudo-scarring, or gray dots,
6. **Bluish-white veil** – unstructured, confluent, irregular areas, with diffuse blue-white depigmentation, associated with pigmented network, dots, globules, striae,
7. **Bright white lines/streaks/crystalline structures** – visible with polarized light, small in length, in a vertical, parallel or angular direction,
8. **Angular lines/polygons** – angular lines that tend to form polygons, of complete or incomplete rhomboid shape,
9. **Irregular or polymorphic linear vessels** irregularly arranged.

**Histopathological examination:** the gold standard in the diagnosis of melanoma. Two important aspects conferred by the histopathological examination are the estimation of tumor thickness (Breslow-BI index) and the presence/absence of ulceration. *Histologically*, specific to melanoma are: the presence of cell nests, poorly defined, with confluence areas (confluent melanocytes), multiple, peripheral nucleoli, in the appearance of a "moth" (peppered moth), pagetoid dispersion. **Immunohistochemistry** is useful in diagnosing melanomas, by performing tests such as: S-100, HMB-45, Melan-A/MART-1, MiTF, and Ki-67. In lesions that are difficult to differentiate (nevus vs. melanoma), **molecular techniques (FISH or CGH)** can also be used to form "maps" of the genetic abnormalities found in the studied tumors, with the role of distinguishing benign tumors from malignant ones.

**Laboratory tests:** depending on the tumoral stage, they start with the usual examinations, then move on to LDH (indicated for patients with distant metastases and TNM classification of the stage of the disease) and S100B (useful for monitoring and assessing the progression of the disease).

#### **Imagistic investigations:**

1. **Skin and soft tissue ultrasound** – initially evaluated by palpating the lymph nodes to discover any clinically palpable nodules.
2. **Computed tomography (CT)/MRI/PET** is not recommended in the primary stages of melanoma but in melanomas with increased tumoral thickness (BI > 4 mm), in which there is a risk of metastasis by lymphatic/blood route, and in those with known metastatic melanoma.
3. **Sentinel lymph node biopsy (SLNB):** important in staging and establishing the patient's prognosis, indicated for patients with BI ≥ 1 mm or BI < 0.8 or 0.8-1 mm if they are at high risk – increased mitotic index, lymphovascular invasion – especially at young ages.

## THE SPECIAL PART

### THE AIMS OF THE RESEARCH

The doctoral thesis contains the following **main objectives**:

- the study of the relationship between nevi and melanoma, and the intercellular relationship (tumor microenvironment) in the onset/progression of melanoma, with identification of the main causes of the appearance of nevi and melanoma (nevogenesis, melanomagenesis),
- the analysis of the clinical, dermatoscopic, and histopathological features specific to common, atypical, or melanoma-confirmed melanocytic lesions included in the study,
- the presentation of standard and modern diagnostic techniques for melanoma, highlighting the main phenotypic and genetic/molecular characteristics (or aberrations) of the studied tumors,
- differentiation of common, atypical nevi and melanoma by standard methods of diagnosis (clinical, dermatoscopy, histopathology), respectively by modern diagnostic techniques – fluorescence in situ hybridization (FISH).

The **secondary objectives** of the study are:

- presentation of new data regarding the onset of melanoma, but also related to its mode of development ("de novo"/ on pre-existing nevi),
- showcasing the usefulness of diagnostic techniques in melanoma (dermoscopy, histopathology, molecular techniques – FISH).

#### **Study 1: Mast cells stimulate angiogenesis in the early stages of tumors- multicenter study.**

**Purpose and motivation of the study** – The interrelationships between melanoma and the tumor microenvironment include: cancer-associated fibroblasts, myeloid-derived suppressor cells, tumor-associated macrophages, clustered differentiation lymphocytes, dendritic, endothelial, lymphatic, and mast cells (MCs). Mast cells can be involved in the development, progression, and metastasis of melanoma through the secretion of proteases, and pro-angiogenic factors - both pro-inflammatory and immunoinhibitory mediators. This is due to the release of angiogenic mediators such as IL-8, NGF, TNF-alpha, TGF-beta, the urokinase-like plasminogen activator, promotion of endothelial cell proliferation, breakdown of the connective tissue matrix, histamine, and the release of VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D. Regarding mast cell density in melanoma, some data have associated a higher number of MCs with more severe melanocyte lesions. Starting from these premises, the aim of the present study (**main objective**) was to evaluate the interrelationship between the microvascular network and mast cell density in melanoma. Thus, the study focuses on observations involving blood vessels and mast cells, emphasizing the potential of mast cells to stimulate angiogenesis. The results on the role of angiogenesis and the effect of mast cells in malignant melanoma are not fully understood, therefore, the role of the study is to provide more information about these facts (**secondary objective**). This study also includes information from a review (based on the article "Review: The tumor microenvironment of melanoma") of the relationship between the tumor microenvironment (TME) and melanoma. This review aims to present the TME's main functions in the development or progression of melanoma.

#### **Study 2: Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) in Melanoma Diagnosis: Pros and Cons.**

**Purpose and motivation of the study** – Melanocytic lesions are often diagnosed with difficulty, as they can have a high morphological heterogeneity. Histopathological examination is the gold standard in the diagnosis of melanoma, but other auxiliary methods of examination can also be used to establish the diagnosis in cases where there are doubts. One of these complementary diagnostic techniques is fluorescence in situ hybridization (FISH), which can differentiate between nevi and melanoma. **Main objective** – Identification of chromosomal abnormalities/genetic mutations in the studied melanocytic

tumors, using FISH. Classification of melanocytic lesions – nevi vs. melanoma using the FISH technique.

**Secondary objectives:**

1. Presentation of general data about FISH (pros and cons).
2. FISH utility, review of the most recent data on the subject from scientific articles.
3. Analysis of chromosomal abnormalities/genetic mutations found in the studied tumors.
4. Correlation of histopathological data with FISH results, to establish the diagnostic value of the FISH test.
5. Comparison of results with data from the literature.

**Study 3: Phenotypic aspects of melanocytic tumors. Standard diagnostic methods in nevi and melanoma.**

This study aimed to analyze the clinical, dermoscopic, and histological aspects of the studied tumors, which resulted in the publication of two original articles. This study was divided into two secondary studies: **Study 3.1**, which presented the similarities between nevi and melanoma using the dermoscopic algorithm "Chaos & Clues", and **Study 3.2**, which aimed to present the main roles of dermoscopy, the standard method in melanoma diagnosis, using dermoscopic algorithms such as the "7-point checklist" and "pattern analysis".

**Study 3.1: Similarities between atypical nevi and melanoma**, based on the article: "**Clinical-dermoscopic similarities between atypical nevi and early stage melanoma**" - **Purpose and motivation of the study:** Dermoscopy is an important diagnostic method in the early detection of melanoma, but it is a subjective method of examination. Therefore, the use of dermoscopic algorithms can help in this problem. **Primary objective** - this study aimed to test the accuracy of specific clinical and dermoscopic criteria to distinguish between benign and malignant tumors, with the **secondary objective** to provide an overview of the clinical and dermoscopic features of atypical nevi and melanoma.

**Study 3.2 – The utility of dermoscopy as a diagnostic method for melanocytic tumors**, based on the article: **The many roles of dermoscopy in melanoma detection.**

**Purpose and motivation of the study:** The gold standard for diagnosing melanoma is the histopathological examination, but dermoscopy is also very important for its detection. **The main objective** of this study was to detect dermoscopic indices of melanomagenesis in the studied melanocytic lesions and to highlight the versatility and multiple roles of dermoscopy. The **second objective** of this study was to determine whether dermoscopy can help estimate the Breslow index (tumoral thickness) of melanomas and to compare the results with histopathological examination.

**Study 4: The main causes of melanoma onset. Nevogenesis versus melanomagenesis**

**Purpose and motivation of the study:** Melanoma is caused by an uncontrolled proliferation of melanocytes, which at first can form a benign lesion (nevogenesis), but over time, that nevus can turn into melanoma, under the influence of mutagenic factors. Some tumors can start spontaneously (de novo melanoma) or on pre-existing lesions (nevus-associated melanoma). **Main objective:** Review of the latest data from specialized articles, regarding the mode of appearance of melanoma (melanomagenesis). **Secondary objectives:** Analysis of the relationship between common and atypical nevi–melanoma – confirmation/or not of the theory of linear progression of nevi to melanoma. List of the main factors involved in the appearance of melanoma/ review data from the literature.

## **MATERIALS AND METHODS**

The research was initiated by studying the specialized literature in the field of the approached subject. Subsequently, the tumors eligible for research were selected and analyzed, and the research hypotheses and the statistical hypotheses were formulated. The necessary data was collected and



entered into a database (Excel), for statistical processing. The statistical analysis was performed using the SPSS v.23 program. (Statistical Package for the Social Sciences) one of the most widely used in statistical data analysis. For the statistical processing performed in this research, the association table (Crosstabs) was used to *compare two qualitative variables*. The significance level (p) of the Likelihood ratio test was considered.

#### **The research methodology of the basic study consisted of:**

1. Selection of eligible tumors for research – common/atypical melanocytic lesions, respectively melanoma.
2. Analysis of the studied group and classification of melanocytic tumors according to phenotype and other clinical/paraclinical aspects (clinical, dermoscopic, histopathological, genetic/molecular examination).
3. Identification of the relationship between common, atypical nevi and melanoma, as well as the relationship of cellularity on melanoma initiation/progression (study of tumoral environment), according to the literature.
4. Study of nevogenesis and melanomagenesis – pathogenesis of nevi, melanoma, and causative factors. Study on the development of melanoma ("de novo"/on pre-existing nevi).
5. Identification of the presence of genetic abnormalities in certain subgroups of patients with atypical nevi and melanomas, through molecular techniques (fluorescence in situ hybridization (FISH)).
6. Collecting the obtained data and entering it into a database.
7. Statistical processing and verification of data and their comparison with those from national/international studies.
8. Drafting the project's final form, presenting the paper, and propagating information by publishing articles in ISI/BDI journals and national and international conferences.

#### **Study 1 - Mast cells stimulate angiogenesis in the early stages of tumors - multicenter study.**

**Research materials and methods:** The study included the examination of a batch n = 162 analyzed cases, with the following distribution: two cases were excluded for technical reasons, 16 cases were lymph node metastases, 22 cases did not present lesions and were used as control, 30 cases were diagnosed as nevi, and 92 were diagnosed as melanomas. A series of benign or malignant melanocytic structures were analyzed, with the primary processing of histopathological specimens obtained by surgical sampling following dermatological consultations and procedures. Also, to compare microvascular density, molecular aspects, and geographical data, the slides were stained with hematoxylin-eosin, and their immunophenotyping was performed with D2-40/Ki-67. **Morphological and immunohistochemical staining.** The morphological evaluation was performed on colored sections with the hematoxylin-eosin method, by standard technique, with an automatic Leica system. The histopathological type of melanoma, the T parameter, pigment, emboli, mitoses, and the degree of differentiation were established by examination of these sections. Double CD34/mast cell tryptase immunostaining was used to identify the vascular and mast cell density elements. **Microscopic evaluation and image analysis.** The morphologically and immunohistochemically stained sections were analyzed on Zeiss Axiocam 506 (Jena, Germany) and Nikon AY260 microscopes, both equipped with a real-time imaging system and software for digital analysis of microscopic images. Microvascular density was evaluated according to the standard Weidner method, respectively the choice of three microscopic fields with maximum vascular density and mast cell density, counting at a target of x400. The arithmetic average of the results obtained/their statistical analysis was performed. For each slide, the tumor and peritumor area were analyzed. This study also includes information from a review based on the importance of the microenvironment of tumor (TME) in melanoma. For this review, the most recent 30 articles were studied based on the role of the TME in melanoma.

#### **Study 2 - Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) in Melanoma Diagnosis: Pros and Cons.**

**Research materials and methods:** We analyzed (initially) 20 melanocytic lesions that were previously diagnosed by dermoscopy and histopathology, between 2017-2022, at a private Dermatology practice in Sibiu, and at the Sibiu County Clinical Hospital, but two of the lesions were eliminated from the study

(cases 15 and 16) due to errors in the pre/post-treatment phase of the FISH. The FISH study was conducted in 2023 at a private analysis center with the help of two pathologists and a dermatologist. The Vysis Melanoma FISH kit from Abbott Molecular was used for this study. This kit can detect the copy number of genes RREB1 (6p25), MYB (6q23), CCND1 (11q13), and centromere 6 (CEP6) by fluorescence in situ hybridization (FISH) using paraffin blocks. The preparation of the samples was carried out and included: histopathological sections were arranged on paraffin blocks, later transformed into histopathological slides, with verification of the initial histopathological diagnosis of the lesions. Subsequently, slides were prepared for denaturation (DNA was denatured in single-stranded form) at 80 °C for 5 min and then hybridization (with Vysis RREB1 / MYB / CCND1 / CEP 6 probes) at 37 °C for 24 hours (pretreatment). After hybridization, the slides were washed with a wash buffer solution (post-treatment) to remove the cover slides, and later, the slides were dried to add the DAPI reagent (the nuclei are counterstained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole), a specific stain that causes blue fluorescence). The cover slides were then glued onto the slides and stored in a special refrigerator before being examined under a fluorescence microscope. Each slide was analyzed with the help of an anatomopathologist and a dermatologist who manually counted all the FISH signals. Subsequently, the obtained data were stored on Microsoft Excel spreadsheets for **statistical analysis**. The results were interpreted based on the melanoma determination methods provided by Abbott Molecular that a sample is FISH positive if: a. average CCND1 signals per nucleus or mean MYB signals per nucleus  $\geq 2.5$  OR b. the percentage loss of MYB to CEP 6 is  $\geq 31\%$ , OR c. the percentage of abnormal nuclei for RREB1  $\geq 63\%$ . Also, FISH – histopathological correlations were made for lesions with ambiguous results on the FISH test.

### **Study 3: Phenotypic aspects of melanocytic tumors. Standard diagnostic methods in nevi and melanoma.**

#### **Study 3.1: Similarities between atypical nevi and melanoma.**

**Research method:** Observational, retrospective study of 103 melanocytic lesions dermatologically monitored between 2017 and 2019 at the Clinical Hospital and private dermatology practices in Sibiu and Oradea County. The lesions were examined clinically, dermoscopically, and histopathologically. The data collected were related to the clinical and dermoscopic characteristics of the lesions, which were examined and reviewed by three evaluators. Tumor sizes were measured in millimeters (mm), and dermoscopic images were evaluated for the presence/absence of chaotic appearance and clues specific to the dermoscopic algorithm "Chaos & Clues" described by Rosendahl *et al.* The dermoscopic colors of the lesions and their clinical criteria were also evaluated. **Statistical analysis.** Data were collected and entered into Microsoft Excel spreadsheets for statistical analysis. The variables were expressed in numbers and percentages to simplify the statistical process. With the help of the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), two qualitative variables were compared with the help of the association table (Crosstabs). The significance level (p) of the Likelihood ratio test was considered.

#### **Study 3.2 – The utility of dermoscopy as a diagnostic method for melanocytic tumors.**

**Research method:** We examined 200 melanocytic lesions (dermatoscopic images) of patients monitored dermatologically between 2017 - 2022 at the Sibiu County Emergency Clinical Hospital and a private dermatology practice in Sibiu. Dermoscopic images were evaluated to detect any signs of melanoma. The most suspicious lesions were either excised or proposed for excision. Of the total number of lesions studied, 10 were melanomas. Also, an attempt was made to determine the tumoral thickness of melanomas to observe whether dermoscopy can be used in this regard. **Statistical analysis:** This was a retrospective and descriptive study. Data were collected and entered into Microsoft Excel spreadsheets for statistical analysis. The variables were expressed in numbers and percentages to simplify the statistical process. With the help of the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), two qualitative variables were compared with the help of the association table (Crosstabs). The significance level (p) of the Likelihood ratio test was considered.

#### **Study 4: The main causes of melanoma onset. Nevogenesis versus melanomagenesis.**

**Research method:** More than 90 of the most recent scientific studies on the key factors responsible for melanoma have been analyzed to review the possible causes of this cutaneous neoplasm. Also, the relationship between nevi and melanoma was analyzed, by studying the most recent national and

international articles on this subject, to deepen and understand the causes of the way melanoma appears ("de novo", "nevus-associated melanoma/on pre-existing nevi") and highlighting the differences of these modes of development in melanoma.

## RESULTS AND DISCUSSIONS

### **Study 1: Mast cells stimulate angiogenesis in the early stages of tumors - multicenter study.**

The study included examining a batch  $n = 162$  cases, of which two cases were excluded for technical reasons, 16 cases were lymph node metastases, 22 did not present lesions and were used as control, 30 cases were diagnosed as nevi and 92 as melanomas. Following the statistical analysis of the data obtained, statistically significant correlations of 95-99% were observed for the analyzed cases (T1, T2, T3) between MVD (vascular microdensity) and peri- / intratumoral mast cell density, respectively intratumoral MVD and intratumoral mast cell density, demonstrating an association between tumor stage and MVD – mast cell density. Patients belonging to T4 showed a statistically significant correlation between MVD and the number of intratumoral mast cells.

In addition to the evaluation of the interrelationships between vascular microdensity and mast cell density, analyzed with the help of the double CD34/MCT immunoreaction, the proliferative character of the lymphatic vessels was evaluated, observing a high density of the lymphatic vessels near the areas with inflammatory infiltrate and on the periphery of the tumor areas. Similar to the results obtained, numerous studies attest to the importance of lymphangiogenesis in the progression and metastasis of melanoma, it seems that melanoma would induce lymphangiogenesis, especially at the level of the stroma (tumor), and that the level of lymphangiogenesis can be considered a prognostic factor in melanoma.

It has been observed that mast cells represent promoters of intra- and peritumoral angiogenesis in the early stages, in the case of melanoma there is a possible involvement of intratumoral mast cells but also of peritumoral ones. Similar to the results obtained, a study conducted by Bahri et al attests to the fact that mast cells have a major impact on the appearance, progression, and metastasis of melanoma, through the secretion of pro-angiogenesis factors, but also of pro-inflammatory and immuno-inhibitory factors. Numerous other studies support the idea that mast cells would be useful in the development of new therapies, which is why numerous targeted therapies (e.g., tyrosine kinase inhibitors) aim to reduce the number of mast cell cells, modulate the activation of MC and their phenotype, and alter the secretion of mediators released by MC and their effects.

Another fact observed was the presence of emboli and inflammatory infiltrate in greater quantity with the increase of the tumor thickness of the melanoma, with 15 cases with inflammatory infiltrate in the case of the T3 tumor stage; in the case of T1, there were only 9 cases with tumor infiltrate. Also, in cases with inflammatory infiltrate and many melanophages, mast cells were located in the infiltrate, and in the absence of infiltrate, few mast cells were noted. Numerous studies attest that the presence of emboli in melanocyte lesions can mean a lymphovascular invasion at that level, a mechanism through which metastasis into melanoma can occur.

The study demonstrated the potential of blood vessels and mast cells to stimulate angiogenesis and may contribute to the progression and initiation of melanoma. The results of melanoma-associated angiogenesis are still uncertain or even controversial, and the real role of mast cells is not fully known.

Regarding the information on the tumoral microenvironment (TME) also presented in the article "Review: The tumor microenvironment of melanoma" the following were found: TME in melanoma is composed of tumor cells and various non-cancerous cells, including immune cells, endothelial cells, fibroblasts, and pericytes. These cells interact with each other, and the altered extracellular matrix influences melanoma progression. The TME plays a key role in melanoma development, as immune

cells, fibroblasts, and macrophages can initially inhibit tumor growth but may later support the tumor's survival, invasion, and metastasis by secreting pro-tumorigenic factors. Additionally, the vascularization of tumors, driven by angiogenesis and vasculogenesis, is influenced by these cells, with factors like VEGF-C promoting metastasis and immune evasion. Recent studies highlight the importance of various TME components, such as mast cells, which contribute to tumor progression by releasing pro-angiogenic and immunoinhibitory mediators, further supporting the intricate relationship between melanoma cells and their microenvironment.

## **Study 2: Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) in Melanoma Diagnosis: Pros and Cons.**

The diagnosis of FISH was established using the criteria provided by Abbott Molecular for the Vysis melanoma kit. First, the signals from each of the 30 nuclei for RREB1, MYB, CCND1, and CEP6 were counted. A sum of 242 signals for RREB1 was observed in a melanoma. The average of the signals for each of the four probes and for each case was also calculated, and the highest average of the signals was observed for RREB1 (183.55 signals/case). The lowest mean of signals was encountered for CEP6, with 169 signals/case.

The number and percentage of abnormal RREB1 nuclei were then calculated. The highest percentage of abnormal nuclei was found in melanomas. There were no FISH+ results for RREB1 (6p25), although the literature states that RREB1 has a very important role in melanoma tumorigenesis and is one of the most sensitive criteria encountered in melanocyte lesions analyzed with the FISH test.

Regarding the sum and mean of MYB and CCND1 signals, the highest amount of signals was found in melanomas. The lowest number of signals was found in two junctional atypical nevi, with 156 signals for MYB and CCND1. To have a positive diagnosis of melanoma, there must be an average of CCND1 or MYB signals per nucleus  $\geq 2.5$ , and these results were obtained only for CCND1 for cases 3 (2.53 signals/nucleus) and 9 (2.56 signals/nucleus). Unlike our study, in which only FISH-positive cases had changes in CCND1 (11q23), in other studies, most cases tested positive due to an abnormality in chromosome 6, while the probe for CCND1 did not play a significant role.

Regarding the positive/negative FISH results, after the analysis of melanocyte lesions, only one benign lesion out of all the nevi studied had a positive FISH diagnosis. The melanoma with the positive FISH test was due to an average CCND1 signals of  $> 2.5$  signals/nucleus, 2.53 signals, which could mean that there were some chromosomal abnormalities found in the 11q23 region of chromosome 11. According to a recent study, there are many false-negative FISH results in the literature, for example, Kerl et al. found a false negative rate of 30.7% using Abbott criteria. In our case, the false-negative rate was 80% (4 out of 5 melanomas had a negative FISH result), while the false-positive percentage for positive FISH tests was 7.69%. Among the benign lesions, one of them (5.55% of the lesions) had a positive FISH result, regarding CCND1 signals (green) with more than 2.5 signals/nucleus (2.56 signals).

FISH histopathological correlations were also performed for cases with ambiguous FISH test results. Some studies show that FISH has been shown to distinguish mitotically active nevi from melanoma. In our study, none of the nevi had mitosis that could have helped establish the diagnosis of FISH. However, 2 melanomas with mitosis were diagnosed as FISH-negative. We also analyzed tumor thickness, emboli, tumor grading, cell infiltration, and pigment presence. None of the tumors had emboli, although the study had 5 melanomas, one of which had a positive FISH result. The tumor thickness for these lesions was analyzed because survival is closely related to it (Breslow index). Regarding the degree of differentiation of the group with ambiguous FISH results (with false negative or false positive FISH results), only a G1 type differentiation (well differentiated) was observed for 5 out of 8 tumors (one of them being a nodular melanoma) and 3 tumors with a moderate degree of G2 differentiation.

The FISH test is a valuable tool, but due to the many false negative results, it should be used in conjunction with other diagnostic techniques (histopathological examination) or for scientific purposes.

### **Study 3: Phenotypic aspects of melanocytic tumors. Standard diagnostic methods in nevi and melanoma.**

#### **Study 3.1: Similarities between atypical nevi and melanoma.**

The study's most specific melanoma criteria included polymorphic vessels, gray/blue structures, eccentric areas without structure, peripheral black dots/globules, followed by white lines, thick reticular/branched lines, and angular lines. White lines were less common in atypical nevi, similar to a study by Verzi et al., which reported that white lines are more specific to melanomas. Recently, the angular lines clue was added to the original "Chaos & clues" algorithm by Jaimes et al., as they believe it is a specific feature of flat melanomas on chronically sun-damaged skin.

In the case of the ABCDE rule, following the statistical analysis, the following were obtained - a statistically significant association between 95-99% was demonstrated for the analyzed elements, as follows: the association between melanoma and the result obtained at the histopathological examination (EHP) was analyzed, obtaining a p-value indicating a statistically significant association of 99% between the mentioned criteria. Subsequently, the association between the presence of melanoma and each of the criteria of the ABCDE rule was analyzed (A - asymmetry, B (border) - contour, C - colors, D - diameter, E - evolution), obtaining the following results: 4 of the 5 criteria showed a statistically significant association between them and melanoma of 99%. The statistical analysis confirms the usefulness of the ABCDE rule in the diagnosis of melanoma, but also of atypical nevi, this technique can also be used by the patient for self-examination. Similar to the results obtained in this study, according to Rezze et al, the "ABCDE rule" may be useful in the clinical diagnosis of atypical nevi. Clinically, the study showed that all biopsied atypical nevi had criterion "E" (evolution) of the "ABCDE rule", which emphasizes the importance of periodic clinical and dermatoscopic examination of these lesions. In the case of melanomas, all the ABCDE criteria were met, except in one case that presented all the ABCDE criteria, but with a diameter of less than 6 mm.

#### **Study 3.2 – The utility of dermoscopy as a diagnostic method for melanocytic tumors.**

Regarding the study results, the 7-point checklist and pattern analysis algorithms were used to analyze the lesions. The 7-point checklist algorithm was found to be a very useful tool to distinguish between nevi and melanoma, as most of the nevi analyzed (169 out of 190 nevi - approximately) had less than 3 points (benign tumors/nevi), while most histopathologically confirmed melanomas (8 out of 10 melanomas) had  $\geq 3$  points (malignant tumors/melanomas).

The pattern analysis algorithm was found to be an important tool in the classification of nevi. It also draws attention to the atypical morphology of some lesions, especially those with two (46.31%) or three models (4.21%).

Concerning *the estimation of tumor thickness*, dermoscopic colors, and specific criteria were used for the studied melanomas, comparing the results with the histopathological examination. Dermoscopic color evaluation was not a very precise criterion for this study, as it did not help establish the exact depth of tumors; for example, one of the SSMs analyzed had blue colors, which means melanin located in the deep dermis, but the tumor had a histopathologically confirmed Breslow index (BI) of 0.5 mm (although it may vary depending on the examined site of the tumor, the experience and knowledge of the pathologist). Our study showed that dermoscopy may not be a very accurate tool for assessing tumor thickness, but in general, it can help guide the clinician in making the right therapeutic decision.

Some of the most common dermoscopic criteria in the melanomas were: polygons (75% - LMM, 40% - SSM), bright white lines (100% in LMM, 40% - SSM), blue-white veil (60% - SSM, 75% - LMM), regression structures (80% - SSM, 100% - LMM), rosettes (40% - SSM, 50% - LMM) and irregular hyperpigmented areas (60% - SSM, 100% - LMM). A study by González-Álvarez et al. states that rosettes can be an indicator of early melanomas, and this may be correct, since one of the tumors studied that had rosettes had an BI of 0.37 mm. The blue-white veil and regression structures were some of the most common dermatoscopic structures specific to melanoma. In a study by Martins da Silva, the blue-white veil is mostly found in invasive melanomas.

#### **Study 4: The main causes of melanoma onset. Nevogenesis versus melanomagenesis.**

Melanoma is a skin cancer with a very complex pathogenesis caused by molecular and genetic mechanisms that are not yet fully understood, and is one of the cancers with the most somatic mutations, according to a study by Alexandrov et al. Exposure to intense UV radiation, a high number of nevi, heredity, age, and fair skin are some of the most important risk factors associated with the increased incidence of melanoma. Clinicopathological examinations for the diagnosis of melanoma must be integrated with molecular techniques to increase the accuracy of melanoma detection and better understand its pathogenesis. The introduction of new techniques for genetic and molecular analysis can lead to a better understanding of the pathogenesis of melanoma. According to a study by Bastian et al., melanomas can be classified into several biological categories, which differ in terms of cell types of origin, clinical/histological presentation, age of onset, type of metastasis, ethnic/gender distribution of patients, role of UV radiation, mutational processes. More research should be carried out to elucidate the clinical relevance of certain molecular mechanisms of melanoma, to improve clinical management, preventive strategies, and patient prognosis. The exact cause of melanoma is not yet fully understood, but numerous factors can initiate and promote its development: from ultraviolet (UV) radiation, genetic factors, geographic location, skin phototype, immunosuppression, viral infections, a large number of nevi, stress, biological/cytological factors to gender.

Despite recent advances in the diagnosis and treatment of advanced melanoma, as mentioned in some studies, the best chance of survival is based on prevention/early detection.

## **CONCLUSIONS**

Melanoma is an aggressive form of skin cancer that can develop spontaneously (de novo) or, according to some authors, through a linear progression from common, atypical nevi, under the influence of key causal factors. Diagnosed in the initial stages, melanoma is curable, with high survival rates, but in an advanced/metastatic stage, the patient's prognosis worsens. Any melanocytic lesion that has changed over time must be verified by standard diagnostic methods (clinical, dermoscopic, histopathological examination) and modern techniques. If a clear diagnosis is not obtained by the usual methods (for example, FISH, CISH, CGH, etc.), modern methods can help establish a certain and early diagnosis.

Early diagnosis of melanoma is of the utmost importance for patients' prognosis, and there is a constant need for improved diagnostic tools, which means that it would be useful to test all possibilities that can help the patient receive a quick and correct diagnosis. This was also exemplified in the results obtained in the doctoral thesis. According to the study, dermoscopy (the importance of using dermatoscopic algorithms such as "7-point checklist", "Chaos & Clues", "Pattern analysis", and the "ABCDE rule") and histopathological examination are the most important methods in the diagnosis of melanoma, which is demonstrated by the results obtained, but the FISH technique has also proven to be very useful.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a tool that provides information on the duplication/amplification, deletion, or translocation of chromosomes and can be used for diagnostic purposes, prognosis, or to monitor patients to see if a treatment has been successful. Based on the FISH study from the thesis, it was found that this technique is a valuable method to help the clinician establish a diagnosis, but it would be recommended to be used as a diagnostic technique complementary to the histopathological examination. The focus of the FISH study was on chromosomal abnormalities found in melanocytic lesions and on the reliability of fluorescence in situ hybridization in diagnosing melanoma.

Also, the study revealed the importance of the tumor microenvironment, especially of mast cells, and their effect on the initiation, progression, and metastasis of melanoma, all these aspects being

underlined in the thesis by a standard original research and two review articles regarding the most important data in the literature concerning melanoma's tumoral microenvironment and its main causative factors (UV radiation, genetic factors, tumor microenvironment, etc.). Understanding the intricate interactions between the tumoral microenvironment and melanoma and the impact of mutagenic factors on melanoma progression is crucial for advancing therapeutic strategies. Future research should target specific TME components to develop more effective antitumor therapies, ultimately improving melanoma treatment and patient outcomes.

### **Personal contributions**

1. The main causal factors of the appearance of nevi and melanoma were revealed by reviewing the most recent scientific articles on this subject.
2. Analysis of the relationship between nevi and melanoma, the study of nevogenesis, and the mode of onset and pathogenesis of melanoma (de novo/spontaneous onset versus melanoma on pre-existing nevi).
3. The study of the tumor microenvironment, the involvement of cells, and angiogenesis in the appearance and progression of melanoma are extremely important elements in providing information related to the biology/pathogenesis of melanoma, which can be useful in managing this neoplasm. The review on the tumoral microenvironment of melanoma highlights the importance of exploring the TME's complex role to inform innovative therapeutic approaches in melanoma care.
4. Analysis of the utility of the main standard diagnostic methods—dermoscopy and histopathological examination—and identification of new ways of using them, for example, the usefulness of dermoscopy in estimating tumoral thickness, an adjuvant element in the choice of safety margins for the excision of melanocytic lesions.
5. Testing of the utility of different dermatoscopic algorithms in the diagnosis of melanoma, namely – “Chaos & Clues,” “7-Point Checklist”, and “Pattern Analysis.”
6. The study of the usefulness (pros and cons) of the FISH technique in diagnosing melanoma/atypical nevi, with the identification of the main chromosomal abnormalities of the tumoral DNA. The fluorescence in situ hybridization technique is not widely used in Romania at the moment to establish the diagnosis of melanoma, but this technique was performed for the first time at the private laboratory where the study was carried out.

**Future research directions**—It is desired to continue the study related to the causes of melanoma, analyze the importance of molecular techniques in diagnosing melanoma, and continue studying the technique of fluorescence in situ hybridization. This will identify new information related to the management of melanoma, benefit patients, and improve their prognosis.

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL II – MORFOLOGIE MICROSCOPICĂ/  
HISTOLOGIE**

**JITIAN CRISTINA-RALUCA**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**ASPECTE FENOTIPICE ȘI MOLECULARE ÎN NEVII ATIPICI ȘI  
MELANOM**

## **R E Z U M A T**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. RAICA MARIUS**

**Timișoara**

**2025**



## INTRODUCERE

Melanomul este unul dintre neoplasmele cu cea mai mare instabilitate genetică, frecvent fiind afectate genele cu rol în: proliferarea celulară (BRAF, NRAS, NF1), metabolismul și creșterea celulară (PTEN, KIT), identitatea celulară (ARID2), rezistența la apoptoză (TP53), controlul ciclului celular (CDKN2A), durata vieții celulare (TERT). Aceste mutații sunt în principal corelate cu vârsta pacientului și cu expunerile carcinogenice (radiația ultravioletă). Diagnosticul melanomului se stabilește în principal pe baza metodelor standard (dermatoscopie, examen histopatologic), însă pot fi utilizate și tehnici ce identifică mutațiile genetice din structurile melanocitare, spre exemplu tehnicile de hibridizare (FISH, CISH, CGH), ș.a.

Teza de doctorat este alcătuită dintr-o **parte introductivă**, o **parte generală** în care sunt prezentate informații teoretice despre tumorile melanocitare benigne și maligne (melanom), și o **parte specială** în care este prezentată cercetarea efectuată în cadrul acestei lucrări. Astfel, **partea specială** a tezei este structurată în patru studii principale: **Studiul 1: Mastocitele stimulează angiogeneza în fazele timpurii ale tumorilor - studiu multicentric.** **Studiul 2: Hibridizarea fluorescentă in situ (FISH) în diagnosticul melanomului – avantaje și dezavantaje.** **Studiul 3: Aspecte fenotipice ale tumorilor melanocitare. Metode standard de diagnostic în nevi și melanom (Studiul 3.1: Similaritățile dintre nevi atipici și melanom, Studiul 3.2: Utilitatea dermatoscopiei ca și metodă de diagnostic a tumorilor melanocitare).** **Studiul 4: Cauzele apariției melanomului. Nevogeneză versus melanomageneză.**

În cadrul fiecărui studiu enumerat mai sus sunt detaliate **scopul, obiectivele principale/secundare, metodele de cercetare, rezultatele** obținute, și **discuțiile**. **Studiul 1** este alcătuit din cercetări standard și conține, de asemenea, o revizuire privind relația dintre micromediul tumoral și melanom. Următoarele două studii (**Studiul 2 și 3**) conțin, de asemenea, cercetări standard, demonstrând utilitatea tehnicilor de diagnostic standard și moderne în melanom, prezentând relația dintre nevi și melanom și testând diverși algoritmi dermatoscopici și tehnici de diagnostic (FISH). **Studiul 4** reprezintă o trecere în revistă a celor mai importante informații din literatura de specialitate privind cauzele melanomului. Referitor la **metodologia de cercetare**, accentul tezei a fost asupra tumorilor incluse în studiu, obținându-se rezultate relevante și similare cu cele întâlnite în literatura de specialitate. Spre finalul lucrării se pot observa **concluziile și contribuțiile personale** legate de acest studiu, **bibliografia**, și **anexele** în care sunt relevate articolele reieșite din rezultatele obținute în urma cercetării.

**Motivația alegerii temei :** Melanomul este un neoplasm agresiv ale cărui mecanisme de acțiune și cauze ale apariției nu sunt pe deplin cunoscute. Înțelegerea biologiei melanomului ar putea fi utilă în îmbunătățirea prognosticului pacienților și în dezvoltarea de noi metode de diagnostic și tratament. **Obiective** - analiza aspectelor fenotipice și moleculare identificate în leziunile melanocitare comune, atipice și maligne din lotul propus spre studiu, cu scopul de a aprofunda modul de acțiune al melanomului și de a înțelege relația dintre nevi și melanom. De asemenea, s-a dorit testarea unor metode de diagnostic rar utilizate în România, și anume, hibridizarea fluorescentă in situ, spre a urmări eficacitatea acesteia.

**Importanța și actualitatea temei de cercetare:** importanța și actualitatea acestei cercetări constă în necesitatea de a îmbunătăți diagnosticul melanomului, în special prin tehnici noi precum FISH, care nu au fost utilizate pe scară largă în România. Descoperirile contribuie la o mai bună înțelegere a patogenezei melanomului și pot ajuta la dezvoltarea unor protocoale de diagnostic îmbunătățite. Teza și toate studiile sale se aliniază cu eforturile internaționale și naționale de îmbunătățire a diagnosticului și prognosticului melanomului. Se dorește aprofundarea studiilor pentru a înțelege cauzele melanomului, pentru a descoperi noi tehnici de diagnostic, și pentru a descoperi utilitatea tehnicilor moleculare în diagnosticul melanomului.

## PARTEA GENERALĂ

Melanocitele sunt celule înalt specializate ce sintetizează și distribuie melanina, cu rol în pigmentarea tegumentului, părului, ochilor și a urechii interne. În pigmentarea tegumentului sunt implicate un număr de aproximativ 128 de gene, ce asigură acest proces printr-un mecanism complex. Perturbarea funcțiilor acestor gene poate determina apariția unor patologii pigmentare, cu afectarea dezvoltării (specificare, migrare, supraviețuire, proliferare), și diferențierii melanocitelor.

Nevii melanocitari sunt tumori benigne ale melanocitelor, iar printre principalele tipuri de nevi sunt:

- **Nevii congenitali (CMN)** : prezenți de la naștere sau între vârsta de 1 lună - 2 ani (CMN tardivi). Frecvent localizați pe trunchi și extremități, rar pe scalp și zona feței. *Clinic*, majoritatea sunt sub formă de macule maronii/plăci cu margini nete sau ușor neregulate, cu hipertricoză (în cele mai multe cazuri), având o pigmentare regulată inițial, în evoluție cu variabilitate a texturii și culorii. *Dermatoscopic*, pot avea un model (pattern) reticular, globular, omogen, în "piatră de pavaj" (globuli mari și poligonali) sau mixt, cu o pigmentare și structură variabilă la unii nevi, putând avea chiar un aspect clinic atipic (policromie, contur neregulat, fenomene de regresie). *Histopatologic*, pot fi joncționali, intradermici sau compuși; pot prezenta atipii ușoare/moderate citologice sau arhitecturale și dispersie pagetoidă. *Un risc mai mare de transformare în melanom* îl au nevi congenitali mari și giganti. Acești nevi rezultă din *mutații somatice postzigotice* ale proteinelor implicate în calea MAPK (mitogen-activated protein kinase pathway), din melanocitele embrionare.
- **Nevii comuni dobândiți**: macule pigmentare/de culoarea pielii, cu aspect uniform, dimensiuni mici (< 6 mm diametru), simetrice, rotund-ovalare, +/- hipertricoză, cu margini bine delimitate. Se dezvoltă pe perioada copilăriei sau la adulți. Se pot localiza în orice zonă anatomică, inclusiv pe palme/plante și aparatul unghial. *Dermatoscopic*, în funcție de localizare pot avea un model reticular/globular (nevi localizați acral au un model dermatoscopic specific), rețea pigmentară normală, culori limitate, pot regresa. *Histopatologic*: *joncționali* (la nivelul epidermului), dermici sau compuși (cu localizare în derm și epiderm); nevi joncționali prezintă un aspect circumscris, cu cuiburi melanocitare în stratul bazal, citoplasmă palidă/pigmentată, cu nuclei mici, monomorfi, epiderm hiperpigmentat cu arhitectură lentiginosă; *nevi compuși* – epiderm normal/ hiperplazic, cu celule epiteloid mari în dermul superficial, celule mici, fusiforme în dermul profund. *Riscul de transformare în melanom* crește cu numărul nevilor, melanomul dezvoltat pe nevi preexistenți fiind identificat într-un procent variabil, în medie de 30%. Printre *mutațiile genetice* întâlnite la nevi dobândiți sunt mutațiile următoarelor gene : BRAF, NRAS, HRAS, HLA-CW6 (nevi Halo), FGFR3, PIK3CA, MITF (factor cheie în producția melaninei), endothelin BRp/1 (rol în melanogeneză), T1799A, BRAF (lentigine după PUVA terapie).

### Elemente ce sugerează transformarea unui nev comun/atipic în melanom:

- Modificări de formă/dimensiuni/culoare a unui nev preexistent (încadrare în *regula ABCDE*, unde A=asimetrie, B=contur neregulat, C=policromie, D=diametru ≥6mm, E=evoluție) sau apariția unei noi leziuni melanocitare ce are caracteristici total diferite de restul nevilor – *semnul rătuștei cea urâte ("ugly duckling sign")*,
- Halou eritematos (*inflamație*) în jurul unui nev preexistent,
- *Prurit*, sensibilitate, *durere*,
- Modificarea suprafeței/texturii nevilui, cu prezența de exudat, scuamo-cruste, *sângerare*, *ulcerație* sau apariția unor noduli.

Nevii atipici sunt structuri cu aspect arhitectural și citologic atipic, frecvent întâlniți la caucazieni. Se formează "de novo", ca parte dintr-un nev melanocitar preexistent, sporadic (prevalență 2-8% la caucazieni) sau în contextul sindromul nevilor atipici (AMS).

### Clinic, nevii atipici diferă de nevii comuni, prin următoarele aspecte:

- diametru > 6 mm,
- contur neregulat, margini imprecise,
- pigmentare variabilă (de la brun la roz-roșu),
- asimetrici,
- pot fi ușor reliefati,
- cu textură netedă sau în piatră de pavaj,
- pot persista/involua (10).

Se pot localiza atât pe zone fotoexpuse (în special pe cele expuse intermitent la radiațiile UV, frecvent pe trunchi) cât și neexpuse – pe fese/zona genitală, etc. Etiologia nevilor atipici nu este clară, dar expresia fenotipică a acestora se pare că ar avea legătură cu factorii de mediu și genetici (ten deschis, fotosensibilitatea, ș.a). **Biologic**, la nevii atipici pot fi regăsite o serie de mutații, și anume : BCL1 (Cyclin D1), CDK6, XRCC1, BRAF, pierdere expresie PTEN, alterare expresie P53, CDKN2A – p16INK4a și p14ARF (în 40% din cazuri în sindromul nevilor atipici), instabilitate cromozomială (1p, 9p).

**Diagnosticul** nevilor atipici și diferențierea de melanom se efectuează prin examinări clinico-paraclinice, principale fiind: dermatoscopia, histopatologia/imunohistochimie, dar și tehnicile moleculare (FISH, CGH) - în cazul unei ambiguități la examenul histopatologic. *Histopatologic*, se observă o hiperplazie lentiginosă melanocitară intraepidermică, cu citoplasmă abundentă, pleomorfism nuclear, cu nuclei mari, atipici, cuiburi celulare cu dimensiuni variabile orizontal orientate, efectuând anastomoze cu crestele adiacente, atipii citologice și arhitecturale, iar tipic este fenomenul de "shouldering" – extensia componentei joncționale a nevilui dincolo de componenta intradermică. Nevii atipici cu displazie severă au un risc crescut de melanom și pot fi greu de deosebit de melanomul în stadii inițiale, însă nu este indicată o excizie profilactică a nevilor, majoritatea melanoamelor dezvoltându-se "de novo". *Managementul nevilor atipici* - este de recomandat să se efectueze excizia unui nev atipic în momentul în care se identifică cel puțin un criteriu din următoarele: structuri gri/albastre, arii hiperpigmentate excentrice, striuri/linii reticulare/ramificate, puncte/globule negre periferice, linii radiale/ pseudopode segmentale, linii albe, vase polimorfe, linii angulare (poligoane).

Melanomul se dezvoltă prin modificări genetice, epigenetice și alogenice ale melanocitelor. În urmă cu aproximativ 26 de ani, Clark et al. (1984) a realizat un model liniar al dezvoltării melanomului, sugerând că nevii ar avea o progresie etapizată, către nevi atipici, melanom, iar într-un final-melanom metastatic. Diverse analize citogenetice ale leziunilor melanocitare, confirmate de către tehnici moleculare (hibridizarea genomică comparativă/CGH) arată o progresie a nevilor către melanom, apoi către metastazare, existând mutații genice/factori cu importanță critică în acest proces.

**Gene/factori implicați în apariția melanomului:** *locusul CDKN2A (9p21)* (specific sindromului FAMMM/sindromul melanomului familial); *TP53* (întâlnită la 25-58% din melanoame; *calea PTEN-AKT (10q24)* – rol în proliferarea și supraviețuirea celulară; *deleția PTEN* (la 28% din liniile celulare ale melanomului, în 7% din melanoamele primare și în 15% din melanoamele metastatice); *gena BRAF* - cea mai comună este *BRAF<sup>V600</sup>* regăsită în peste 90% din mutațiile specifice melanomului; *RAS/NRAS* (la 15-25% din melanoame); *calea NRAS-BRAF-MEK-ERK (MAP kinase)*-mare importanță în geneza melanomului ; *gena MET* (întâlnită în melanomul metastatic); *KIT*: mutație din melanoamele apărute pe zonele afectate de radiațiile ultraviolete (fotoexpuse); *NEDD9* (factor prometastază, mutația sa conferă melanocitelor capacitatea de invazie și metastazare); alte/alți gene/factori de transcripție: *RTK, PTPRD, MITF, TBX2, MYC, miRNAs, ș.a* – rol în tumorigeneză. Odată transformate malign, melanocitele proliferază autonom, rezistă diferențierii și semnalelor de inhibare a creșterii.

**Principalii factorii de risc pentru apariția melanomului sunt** (influențați de un teren genetic preexistent ce determină o anumită fotosensibilitate a pacientului):

**-Radiațiile ultraviolete:** factor carcinogen, mai ales în cazul unei expuneri intermitente, cumulative (cronice). Expunerea la soare și **factorul genetic** sunt cei mai importanți în declanșarea melanomului.

Același risc îl include expunerea la lumină artificială – psoralen + UVA (PUVA), UVB (bronz artificial). Explicația apariției melanomului în urma acțiunii radiațiilor UV, este dată de faptul că acestea au un efect carcinogenetic, inflamator, imunosupresiv asupra ADN-ului celular, contribuind la inițierea, progresia și chiar metastazarea unui eventual melanom primar. UVB (280-320 nm) afectează direct ADN-ul celular, iar UVA (320-400 nm) produce reactivi liberi de oxigen (ROS).

**-Fenotipul cutanat:** tenul deschis la culoare, părul de culoare blondă sau roșcată, ochii verzi sau albaștri, prezența pistriurilor și tendința la arsuri solare (fototip cutanat I-II) sunt aspecte fenotipice asociate cu un risc crescut de melanom, acesta dezvoltându-se mai rar la persoane cu fototip cutanat V-VI, sugerând faptul că pigmentul cutanat joacă un rol protector.

**-Istoric personal/familial de melanom:** Melanomul familial este un termen referitor la familiile în care 2 sau mai multe rude de gradul 1 prezintă melanom. Acest tip de neoplasm poate fi dobândit genetic, existând riscul de transmitere din generație în generație. Diferite gene sunt responsabile de apariția melanomului familial, și anume : CDKN2A – în 40% din cazuri (mutații cromozom 9p21), CDK4, POT1, TERT.

**-Alți factori:** fototip cutanat (I,II) – indivizii cu ten deschis au un risc crescut de melanom; numărul crescut de nevi, deficitul de vitamina D, prezența de nevi atipici; inflamația cronică; istoric familial de melanom; imunodepresie ; fumat/alcool ; stress.

Din punct de vedere **clinic**, principalele **subtipuri ale melanomului cutanat** sunt:

**-Melanomul extensiv în suprafață (SSM):** cel mai comun, 70% din totalul acestor tumori. Diagnosticat mai frecvent pe zone anatomice intermitent expuse la radiațiile UV. Aspectul clinic se încadrează în regula ABCD (asimetrie, contur neregulat, variabilitate a culorii, diametru peste 5 mm). Apare cel mai adesea pe nevi preexistenți (nevus-associated melanoma – NAM). SSM se dezvoltă pe parcursul a câtorva luni/ani. Mutatie BRAF des întâlnită.

**-Melanomul nodular (NM):** al doilea cel mai comun subtip (15-30%), trunchiul fiind cea mai afectată zonă anatomică. Acest tip de melanom este mai agresiv, cu o creștere rapidă, pe verticală. Tipic, apare mai frecvent "de novo". Clinic, este o leziune negru-albăstruie, roz-roșie sau roșie-albăstruie, reliefată, 5% din leziuni fiind **acrome (melanom amelanotic)**. Inițial, poate fi simetric, cu contur regulat și culoare uniformă, apoi se modifică. Nu poate fi identificat prin intermediul algoritmului ABCDE, ci cu ajutorul EFG (elevated-nodul elevat, firm-ferm, growing - în creștere) și a altor algoritme. Mutatie BRAF frecvent întâlnită.

**-Lentigo malign (LM) și melanom tip lentigo malign (LMM):** LM este o formă de melanom in situ cu o fază de creștere radială prelungită, ce în timp devine invazivă, dezvoltându-se melanomul tip lentigo malign (LMM). Diagnosticate frecvent în jurul vârstei de 60-70 de ani, rar sub 40 de ani, cea mai frecventă locație este pe zonele cronic expuse la soare. Clinic, sunt leziuni plane ce se măresc lent, macule de culoare brună, cu formă neregulată și diferite nuanțe de brun pe suprafață. Mutațiile frecvent regăsite la acest tip de melanom sunt : c-KIT (28%), BRAF (6%).

**-Melanom acral lentiginos (ALM):** comun la persoanele de culoare, cu vârsta medie de 65 de ani, cu localizare frecventă la nivelul plantelor, palmelor și subunghial. Clinic, la nivel palmo-plantar prezintă culori de la brun la negru, poate avea și contur neregulat. Un semn specific melanomului subunghial este semnul Hutchinson-pigment melanic la nivelul pliului unghial proximal. Mutațiile frecvent întâlnite la acest subtip sunt : BRAF (21%), c-KIT (13%).

Diagnosticul precoce este cheia unui prognostic bun, odată descoperit în stadii inițiale (melanom in situ) acesta poate să fie vindecat prin tratament chirurgical. Modificările de culoare și dimensiuni sunt cele mai comune semne ce pot să ajute la diferențierea între un nev comun și melanom.

**Examinarea fizică:** necesar să se realizeze în lumină naturală, printr-o examinare atentă a întregii suprafețe cutanate, dar și a mucoaselor. Diagnosticul clinic al melanomului poate fi stabilit în 80-90% din cazuri, folosind regula ABCDE.

**Dermatoscopia:** ajută la vizualizarea structurilor și culorilor din leziuni, aspecte ce nu sunt vizibile cu ochiul liber. Câteva aspecte specifice melanomului, din punct de vedere **dermatoscopic**:

- **Rețea pigmentară atipică** – de culoare neagră/brună/gri, cu orificii neregulate, linii groase distribuite neregulat ce se termină brusc la periferie,
- **Arii pigmentare (blotches) neregulate** negre/brun închise, fără structuri sau cu structuri discrete localizate non-central,
- **Puncte/ globule atipice** – negre, brune, rotunde sau ovalare, de diferite mărimi, distribuite neregulat,
- **Striuri/pseudopode neregulate** – de culori variate de la brun deschis până la brun închis, pornind din centru, distribuite neregulat,
- **Regresie** – culoare albă, pseudo-cicatriceală sau sub formă de puncte gri,
- **Vălul alb-albăstrui** – arii lipsite de structuri, confluențe, neregulate, cu depigmentare alb-albăstruie difuză, asociate cu rețea pigmentară, puncte, globule, striuri,
- **Linii/striuri albe strălucitoare/structuri cristaline** – vizibile cu lumina polarizată, mici ca și lungime, în direcție verticală, paralelă sau angulară,
- **Linii angulare/poligoane** – linii angulare ce au tendința de a forma poligoane, de formă romboidală completă sau incompletă,
- **Vase liniare neregulate sau polimorfe**, dispuse neregulat.

**Examenul histopatologic:** gold-standard-ul în diagnosticul melanomului. Două aspecte importante conferite de examenul histopatologic sunt estimarea grosimii tumorale (indice Breslow-BI) și prezența/absența ulcerăției, factori de prognostic importanți și în alegerea tratamentului corespunzător. *Histologic*, specifice melanomului sunt: prezența cuiburilor celulare, slab conturate, cu arii de confluență (melanocite confluențe), nucleoli multipli, periferici, în aspect de "molie" (peppered moth), dispersie pagetoidă. **Imunohistochimia** utilă în cazul melanoamelor, prin efectuarea de testări cum sunt: S-100, HMB-45, Melan-A/MART-1, MiTF, Ki-67. În cazul unor leziuni greu de diferențiat (nev vs. melanom) se pot folosi și **tehnici moleculare (FISH sau CGH)** ce formează "hărți" ale anomaliilor genetice regăsite în tumorile studiate, având rolul de a distinge tumorile benigne de cele maligne.

**Teste de laborator :** în funcție de stadiul tumoral, acestea pornesc de la examinările uzuale, până la LDH (indicat pacienților cu metastaze la distanță și pentru clasificarea TNM a stadiului bolii), S100B (util pentru monitorizare, pentru a evalua progresia bolii).

#### **Investigații imagistice :**

- **ecografie cutanată și de părți moi** – inițial evaluare prin palparea ganglionilor limfatici, pentru a descoperi eventuali noduli clinic palpabili.
- **computer tomografia (CT)/RMN/PET** – nerecomandate în stadiile primare ale melanomului, ci în melanoamele cu grosime tumorală crescută (BI > 4 mm), la care există risc de metastazare pe cale limfatică/sanguină și la cei cu melanom metastatic cunoscut.

**Biopsia ganglionului sentinelă (SLNB) :** importantă în stadializarea și stabilirea prognosticului pacientului, indicată pacienților cu BI ≥1 mm sau BI <0.8 sau 0.8-1 mm dacă au risc crescut – indice mitotic crescut, invazie limfovaculară – mai ales la vârste tinere.

## PARTEA SPECIALĂ

### SCOPUL LUCRĂRII

Teza de doctorat conține următoarele **obiective principale**:

- studiul relației dintre nevi și melanom și relația intercelulară (micromediul tumoral) în debutul/progresia melanomului, cu identificarea principalelor cauze ale apariției nevilor și melanomului (nevogeneză, melanomageneză),
- analiza caracteristicilor clinice, dermatoscopice și histopatologice specifice leziunilor melanocitare comune, atipice sau confirmate ca fiind melanom incluse în studiu,
- prezentarea tehnicilor standard și moderne de diagnostic pentru melanom, evidențiind principalele caracteristici fenotipice și genetice/moleculare ale tumorilor studiate,
- diferențierea nevilor comuni, atipici și a melanomului prin metode standard de diagnostic (clinic, dermatoscopie, histopatologie), respectiv prin tehnici moderne de diagnostic – hibridizare fluorescentă in situ (FISH).

**Obiectivele secundare** ale studiului sunt:

- prezentarea de date noi în ceea ce privește debutul melanomului, dar și legate de modul de dezvoltare al acestuia ("de novo"/ pe nevi preexistenți) al acestuia,
- evidențierea utilității tehnicilor de diagnostic în melanom (dermatoscopie, histopatologie, tehnici moleculare – FISH).

#### **Studiul 1: Mastocitele stimulează angiogeneza în fazele timpurii ale tumorilor- studiu multicentric.**

**Scopul și motivația studiului** – În interrelațiile dintre melanom și micromediul tumoral sunt implicate: fibroblastele asociate cancerului, celulele supresoare derivate din mieloide, macrofagele asociate tumorilor, limfocitele de diferențiere dispuse în cluster, celulele dendritice, endoteliale, limfatice și mastocitele (MC). Mastocitele pot fi implicate în dezvoltarea, progresia și metastazarea melanomului malign prin secreția de proteaze, factori pro-angiogenici - atât mediatori proinflamatori, cât și imuno-inhibitori. Acest lucru se datorează eliberării de mediatori angiogeni, cum ar fi IL-8, NGF, TNF-alfa, TGF-beta, activatorul plasminogenului de tip urokinază, promovarea proliferării celulelor endoteliale, degradarea matricei țesutului conjunctiv, histamină și eliberarea VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D. În ceea ce privește densitatea mastocitelor în melanom, unele date au asociat un număr mai mare de MC cu leziuni melanocitare mai severe. Pornind de la aceste premise, **scopul prezentului studiu (obiectiv principal)** a fost de a evalua interrelația dintre rețeaua microvasculară și densitatea mastocitelor în melanomul malign. Astfel, studiul este axat pe observațiile ce implică vasele sanguine și celulele mastocitare, cu accent asupra potențialului mastocitelor de a stimula angiogeneza. Rezultatele asupra rolului angiogenezei și al efectului mastocitelor în melanomul malign nu sunt pe deplin înțelese, de aceea, rolul studiului este acela de a furniza mai multe informații în legătura cu aceste fapte (**obiectiv secundar**). Acest studiu include, de asemenea, informații dintr-un rezumat al celor mai noi informații din literatura de specialitate despre (vezi articolul "Review: The tumor microenvironment of melanom") relația dintre micromediul tumoral (TME) și melanom. Acest review își propune să prezinte principalele funcții ale TME în dezvoltarea sau progresia melanomului.

#### **Studiul 2: Hibridizarea fluorescentă in situ (FISH) în diagnosticul melanomului – avantaje și dezavantaje.**

**Scopul și motivația studiului** – Leziunile melanocitare sunt adesea diagnosticate cu dificultate, deoarece pot avea o heterogenitate morfologică înaltă. Examenul histopatologic este standardul de aur în diagnosticul melanomului, dar pot fi utilizate și alte metode auxiliare de examinare pentru stabilirea diagnosticului în cazurile în care există îndoieli. Una dintre aceste tehnici complementare de diagnostic

este hibridizarea fluorescentă in situ (FISH), ce poate diferenția între nevi și melanom. **Obiectiv principal** – Identificarea anomaliilor cromozomiale/mutațiilor genetice din tumorile melanocitare studiate, prin intermediul tehnicii FISH. Clasificare leziuni melanocitare – nevi vs. melanom cu ajutorul tehnicii FISH.

- **Obiective secundare:**

- Prezentare date generale despre tehnica FISH (avantaje și dezavantaje).
- Utilitate FISH, review date articole științifice recente.
- Analiză anomalii cromozomiale/mutații genetice întâlnite în tumorile studiate.
- Corelare date histopatologice cu rezultatele FISH, în vederea stabilirii valorii diagnostice a testului FISH.
- Comparare rezultate cu datele din literatura de specialitate.

### **Studiul 3: Aspecte fenotipice ale tumorilor melanocitare. Metode standard de diagnostic în nevi și melanom.**

În acest studiu s-a urmărit analiza aspectelor clinice, dermatoscopice și histologice ale tumorilor studiate, în urma cărora a rezultat publicarea a două articole originale. Acest studiu a fost împărțit în două studii secundare, în primul studiu secundar (**Studiul 3.1**) urmărindu-se similaritățile dintre nevi și melanom, cu ajutorul algoritmului dermatoscopic "Chaos & Clues", iar al doilea studiu secundar (**Studiul 3.2**) urmărește prezentarea principalelor roluri ale dermatoscopiei, metodă standard în diagnosticul melanomului, cu analiza tumorilor cu ajutorul algoritmilor dermatoscopice "7-point checklist" și "pattern analysis".

**Studiul 3.1: Similaritățile dintre nevi atipici și melanom**, bazat pe articolul: „**Clinical-dermoscopic similarities between atypical nevi and early stage melanoma**” - **Scopul și motivația studiului:** Dermatoscopia este o metodă importantă de diagnostic în detectarea precoce a melanomului, însă este o metodă subiectivă de examinare. Prin urmare, utilizarea algoritmilor dermatoscopici poate ajuta în această problemă. **Obiectiv principal** - acest studiu și-a propus să testeze acuratețea criteriilor clinice și dermatoscopice specifice pentru a distinge între tumorile benigne și maligne, cu **obiectivul secundar** de a oferi o imagine de ansamblu asupra caracteristicilor clinice și dermatoscopice ale nevilor atipici și melanomului.

**Studiul 3.2 – Utilitatea dermatoscopiei ca și metodă de diagnostic a tumorilor melanocitare**, bazat pe articolul: **The many roles of dermoscopy in melanoma detection**.

**Scopul și motivația studiului:** Standardul de aur pentru diagnosticul melanomului este examenul histopatologic, dar dermatoscopia este, de asemenea, foarte importantă pentru detectarea acestuia. **Obiectivul principal** al acestui studiu a fost de a detecta prin dermatoscopie indicii de melanomagenză în leziunile melanocitare studiate și de a evidenția versatilitatea și multiplele roluri ale dermatoscopiei. Al doilea obiectiv al acestui studiu (**obiectiv secundar**) a fost de a stabili dacă dermatoscopia poate ajuta la estimarea indicelui Breslow (grosimea tumorală) al melanoamelor și de a compara rezultatele cu examenul histopatologic.

### **Studiul 4: Cauzele apariției melanomului. Nevogeneză versus melanomagenză.**

**Scopul și motivația studiului:** Melanomul este cauzat de o proliferare necontrolată a melanocitelor, ce la început pot forma o leziune benignă (nevogeneză), dar în timp, acel nev se poate transforma în melanom, având loc, melanomagenza, sub influența unor factori mutageni. Unele tumori pot debuta spontan (melanom de novo) sau pe leziuni preexistente (melanom asociat nevilor). **Obiectiv principal:** Review al celor mai noi date din articolele de specialitate, în ceea ce privește modul de apariție al melanomului (melanomagenza). **Obiective secundare:** Analiză relație nevi comuni - atipici – melanom – confirmare/infirmare teorie progresie liniară a nevilor spre melanom. Enumerarea principalilor factori implicați în apariția melanomului/ review date din literatura de specialitate.

## MATERIALE ȘI METODĂ

Lucrarea a fost inițiată prin studiul literaturii de specialitate din sfera subiectului abordat. Ulterior, s-au selectat și analizat tumorile eligibile pentru cercetare, s-au formulat ipotezele de cercetare, ipotezele statistice. Datele necesare au fost colectate și introduse într-o bază de date (Excel), cu prelucrarea statistică a acestora. Prelucrarea statistică s-a efectuat utilizând programul SPSS v.23. (Statistical Package for the Social Sciences) unul dintre cele mai utilizate în analiza statistică a datelor. Pentru analiza statistică efectuată în această cercetare s-a utilizat pentru *compararea a două variabile calitative* tabelul de asociere (Crosstabs). S-a considerat nivelul de semnificație (p) a testului Likelihood ratio.

### Metodologia de cercetare a studiului de bază a constat în:

- Selectarea tumorilor eligibile pentru cercetare – leziuni melanocitare benigne comune/atipice, respectiv melanom.
- Analiza lotului studiat și clasificarea tumorilor melanocitare în funcție de fenotip/alte aspecte clinice/paraclinice (examen clinic, dermatoscopic, histopatologic, molecular).
- Identificarea relației dintre nevii comuni, atipici și melanom, dar și a relației celularității asupra inițierii/progresiei melanomului (studiul mediului tumoral), conform literaturii de specialitate.
- Studiul nevogenezei și al melanomogenezei – patogeneza nevilor, a melanomului și a factorilor cauzali. Studiul modului de apariție a melanomului ("de novo"/pe nevi preexistenți).
- Identificarea prezenței anomaliilor genetice la anumite subgrupe de pacienți cu nevi atipici și melanoamele studiate, prin tehnici moleculare (hibridizare fluorescență in situ (FISH)).
- Colectarea datelor obținute și introducerea lor într-o bază de date.
- Prelucrarea și verificarea statistică a datelor, compararea lor cu cele din studiile naționale și internaționale.
- Redactarea formei finale a proiectului, prezentarea lucrării, propagarea informației prin publicarea de articole în reviste cotate ISI/BDI și în cadrul conferințelor naționale și internaționale de specialitate.

### Studiul 1 - Mastocitele stimulează angiogeneza în fazele timpurii ale tumorilor- studiu multicentric.

**Materiale și metode de cercetare:** Studiul a cuprins examinarea unui lot n= 162 cazuri analizate, cu următoarea distribuție: două cazuri au fost excluse din motive tehnice, 16 cazuri au fost metastaze limfonodale, 22 cazuri nu au prezentat leziuni și au fost folosite drept control, 30 de cazuri au fost diagnosticate ca nevi și 92 au fost diagnosticate ca melanoame. S-au analizat o serie de structuri melanocitare benigne sau maligne, cu procesarea primară a unor piese histopatologice obținute prin prelevarea chirurgicală a acestora în urma unor consulturi și proceduri dermatologice. De asemenea, pentru studiul densității microvasculare s-au comparat aspecte moleculare, date geografice, s-a efectuat colorația lamelor cu hematoxilină-eozină, și imunofenotiparea acestora cu D2-40/Ki-67.

**Colorație morfologică și imunohistochimică.** Evaluarea morfologică a fost efectuată pe secțiunile colorate cu metoda hematoxilină-eozină, prin tehnică standard, cu sistem automat Leica. Tipul histopatologic al melanomului, parametrul T, pigmentul, embolii, mitozele și gradul de diferențiere au fost stabilite prin examinare pe aceste secțiuni. A fost utilizată imunocolorarea dublă CD34/triptază mastocitară pentru a identifica cele două elemente - densitatea vasculară și a mastocitelor.

**Evaluare microscopică și analiză de imagini.** Secțiunile colorate morfologic și imunohistochimic au fost analizate pe microscopie Zeiss Axiocam 506 (Jena, Germania) și Nikon AY260, ambele echipate cu un sistem de imagistică în timp real și software pentru analiza digitală a imaginilor microscopice. Evaluarea densității microvasculare s-a realizat după metoda standard Weidner, respectiv alegerea a trei câmpuri microscopice cu densitate vasculară maximă și densitate mastocitară, numărarea făcându-se la un obiectiv de x400. S-a efectuat media aritmetică a rezultatelor obținute/analiza statistică a acestora. Pentru fiecare lamă au fost analizate tumorală și zona peritumorală.



Acest studiu include, de asemenea, informații dintr-un review despre importanța micromediului tumoral (TME) în melanom. Pentru acest review s-au studiat cele mai recente 30 de articole din literatură de specialitate pe tema rolului TME în melanom.

## **Studiul 2 - Hibridizarea fluorescentă in situ (FISH) în diagnosticul melanomului – avantaje și dezavantaje.**

**Materiale și metode de cercetare:** S-au analizat (inițial) 20 de leziuni melanocitare ce au fost diagnosticate anterior prin dermatoscopie și histopatologie, între anii 2017-2022, la un cabinet privat de Dermatologie din Sibiu, și la Spitalul Clinic Județean din Sibiu, însă două dintre leziuni au fost eliminate din studiu (cazurile 15 și 16) din cauza unor erori în faza pre/posttratament FISH a studiului. Studiul FISH a fost realizat în anul 2023 la un centru privat de analiză cu ajutorul a unui anatomopatolog, asistent laborator, și a unui dermatolog. Pentru acest studiu, s-a folosit kit-ul Vysis Melanoma FISH de la Abbott Molecular. Acest kit poate detecta numărul de copii al genelor RREB1 (6p25), MYB (6q23), CCND1 (11q13) și al centromerului 6 (CEP6) prin hibridizare fluorescentă in situ (FISH) cu ajutorul unor blocuri de parafină. Pregătirea probelor: utilizarea unor secțiuni histopatologice dispuse pe blocuri de parafină, transformate ulterior în lame histopatologice, cu verificarea histopatologică a diagnosticului histopatologic inițial al leziunilor. Ulterior, s-au pregătit lamele pentru denaturare (ADN-ul a fost denaturat în formă monocatenară) la 80 ° C timp de 5 minute și apoi hibridizare (cu sondele Vysis RREB1 / MYB / CCND1 / CEP 6) la 37°C timp de 24 de ore (pretratate). După hibridizare, lamele au fost spălate cu o soluție tampon de spălare (posttratate) pentru a îndepărta lamelele, iar mai târziu, lamele au fost uscate pentru a adăuga reactivul DAPI (nucleii sunt contracolorați cu DAPI (4,6 diamidino-2-fenilindol). Apoi, lamelele au fost lipite pe lame și depozitate într-un frigider special înainte de a le examina la un microscop cu fluorescență. Fiecare lamă a fost analizată cu ajutorul unui anatomopatolog și al unui dermatolog ce au numărat manual toate semnalele FISH. Ulterior, au fost stocate datele obținute pe foi de calcul Microsoft Excel pentru **analiză statistică** [calculul prevalenței variabilelor (%)]. Au fost interpretate rezultatele pe baza metodelor de determinare a melanomului furnizate de Abbott Molecular care atestă că o probă este melanom FISH pozitiv dacă: a. media semnalelor CCND1 per nucleu sau media semnalelor MYB per nucleu  $\geq 2,5$  SAU b. pierderea procentuală a MYB în raport cu CEP 6 este de  $\geq 31\%$ , SAU c. procentul de nuclei anormali pentru RREB1  $\geq 63\%$ . De asemenea, s-au realizat corelații FISH – histopatologice pentru leziunile cu rezultate ambigue la testul FISH.

## **Studiul 3: Aspecte fenotipice ale tumorilor melanocitare. Metode standard de diagnostic în nevi și melanom.**

### **Studiul 3.1: Similaritățile dintre nevii atipici și melanom**

**Metodă de cercetare:** Studiu observațional, retrospectiv, a 103 leziuni melanocitare monitorizate dermatologic în perioada 2017-2019 la Spitalul Clinic și cabinete private de dermatologie din Sibiu și județul Oradea. Leziunile au fost examinate clinic, dermatoscopic și histopatologic. Datele colectate au fost legate de caracteristicile clinice și dermatoscopice ale leziunilor, ce au fost examinate și revizuite de trei evaluatori. Dimensiunile tumorilor au fost măsurate în milimetri (mm), iar imaginile dermatoscopice au fost evaluate pentru prezența/absența unui aspect haotic și al indiciilor specifice algoritmului dermatoscopic "Chaos & Clues" descris de Rosendahl *et al.* Culoarele dermatoscopice ale leziunilor și criteriile lor clinice au fost, de asemenea, evaluate. **Analiza statistică.** Datele au fost colectate și introduse pe foi de calcul Microsoft Excel pentru analiză statistică [calculul prevalenței variabilelor (%), dimensiunea mediană a leziunilor și numărul de culori]. Variabilele au fost exprimate în numere și procente pentru a simplifica procesul statistic. Cu ajutorul programului SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), s-a efectuat compararea a două variabile calitative cu ajutorul tabelul de asociere (Crosstabs). S-a considerat nivelul de semnificație (p) a testului Likelihood ratio.

### **Studiul 3.2 – Utilitatea dermatoscopiei ca și metodă de diagnostic a tumorilor melanocitare**

**Metoda de cercetare:** S-au examinat 200 de leziuni melanocitare (imagini dermatoscopice) ale pacienților monitorizați dermatologic în perioada 2017-2022 la Spitalul Clinic Județean de Urgență Sibiu și la un cabinet privat de dermatologie din Sibiu. S-au evaluat imaginile dermatoscopice pentru a detecta orice indiciu de melanom. Cele mai suspecte leziuni au fost fie excizate, fie propuse pentru excizie. Din totalul leziunilor studiate, 10 s-au dovedit a fi melanoame, ce au fost confirmate

histopatologic. De asemenea, s-a încercat determinarea grosimii tumorale a melanoamelor pentru a stabili dacă dermatoscopia poate fi utilizată în acest sens și s-au comparat rezultatele dermatoscopice obținute cu cele histopatologice. **Analiza statistică:** Acesta a fost un studiu retrospectiv și descriptiv. Datele au fost colectate și introduse pe foi de calcul Microsoft Excel pentru analiză statistică [calcularea prevalenței variabilelor (%)]. Variabilele au fost exprimate în numere și procente pentru a simplifica procesul statistic. Cu ajutorul programului SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), s-a efectuat compararea a două variabile calitative cu ajutorul tabelul de asociere (Crosstabs). S-a considerat nivelul de semnificație (p) a testului Likelihood ratio.

#### **Studiul 4: Cauzele apariției melanomului. Nevogeneză versus melanomogeneză.**

**Metodă de cercetare:** Au fost analizate peste 90 dintre cele mai recente studii științifice referitoare la factorii cheie responsabili de apariția melanomului, cu scopul de a realiza un review ale cauzelor posibile ale acestui neoplasm cutanat. De asemenea, a fost analizată relația dintre nevi și melanom, prin studiul celor mai recente articole naționale și internaționale referitoare la acest subiect, cu scopul de a aprofunda și de a înțelege cauzele modului de apariție al melanomului ("de novo", "nevus-associated melanoma/pe nevi preexistenți") și sublinierea diferentelor ale acestor moduri de dezvoltare în melanom.

## **REZULTATE ȘI DISCUȚII**

### **Studiul 1: Mastocitele stimulează angiogeneza în fazele timpurii ale tumorilor- studiu multicentric**

Studiul a cuprins examinarea unui lot  $n = 162$  cazuri, dintre care două cazuri au fost excluse din motive tehnice, 16 cazuri au fost metastaze limfonodale, 22 cazuri nu au prezentat leziuni și au fost folosite drept control, 30 de cazuri au fost diagnosticate ca nevi și 92 ca melanoame. În urma analizei statistice a datelor obținute, s-au observat corelații semnificativ statistice de 95-99% pentru cazurile analizate (T1, T2, T3) între MVD (microdensitatea vasculară) și densitatea mastocitară peri- / intratumorală, respectiv MVD intratumorală și densitatea mastocitară intratumorală, demonstrând o asociere între stadiul tumoral și MVD – densitatea mastocitară. Pacienții aparținând T4 au prezentat o corelație semnificativ statistică, între MVD și numărul mastocitelor intratumorale.

Pe lângă evaluarea interrelațiilor între microdensitatea vasculară și densitatea mastocitară, analizate cu ajutorul dublei imunoreacții CD34/MCT a fost evaluat caracterul proliferativ al vaselor limfatice, observându-se o densitate mare a vaselor limfatice în imediata vecinătate a zonelor cu infiltrat inflamator și la periferia arilor tumorale. Similar cu rezultatele obținute, numeroase studii atestă importanța limfangiogenezei în progresia și metastazarea melanomului. Se pare că melanomul ar induce limfangiogeneza mai ales la nivelul stromei (tumoral), și că nivelul limfangiogenezei poate fi considerat un factor de prognostic în melanom. Studiile atestă că VEGF-C eliberat de celulele melanomului, și de către macrofage, ar fi un factor major cauzator al limfangiogenezei, deși pot fi implicați și alți factori VEGF.

S-a observat că mastocitele reprezintă promotori ai angiogenezei intra- și peritumorale în etapele incipiente, în cazul melanomului existând o posibilă implicare a mastocitelor intratumorale dar și a celor peritumorale. Similar rezultatelor obținute, un studiu realizat de Bahri et al atestă faptul că mastocitele au un impact major în apariția, progresia, metastazarea melanomului, prin secreția de factori pro-angiogeneză, dar și a factorilor pro-inflamatori și imuno-inhibitori. Numeroase alte studii susțin ideea că mastocitele ar fi utile în dezvoltarea de noi terapii, motiv pentru care numeroase terapii țintite (de exemplu, inhibitorii de tirozin kinază) au ca scop reducerea numărului de celule mastocitare, modularea activării MC și al fenotipului lor, și alterarea secreției de mediatori eliberați de MC și al efectelor acestora. Un alt fapt observat a fost prezența embolilor, și al infiltratului inflamator în cantitate mai importantă odată cu creșterea grosimii tumorale a melanomului, fiind 15 cazuri cu infiltrat inflamator în cazul stadiului tumoral T3, în cazul T1 fiind doar 9 cazuri cu infiltrat tumoral. De asemenea, la cazurile cu infiltrat inflamator și multe melanofage, mastocitele au fost localizate în infiltrat, iar în absența

infiltratului, au fost remarcate puține mastocite. Numeroase studii atestă că prezența embolilor în leziunile melanocitare pot semnifica că la acel nivel există o invazie limfovaculară, mecanism prin care poate avea loc metastazarea în melanom. Studiul a demonstrat un potențial al vaselor sanguine și al mastocitelor, de a stimula angiogeneza, putând contribui la progresia și inițierea melanomului. Rezultatele asupra angiogenezei asociat melanomului sunt încă incerte sau chiar controversate, iar rolul real al mastocitelor nu este pe deplin cunoscut.

În ceea ce privește informațiile despre micromediul tumoral (TME) prezentate și în articolul "Review: Micromediul tumoral al melanomului" s-au constatat următoarele: TME în melanom este compus din celule tumorale și necanceroase, inclusiv celule imune, celule endoteliale, fibroblaste și pericite. Aceste celule interacționează între ele, influențând progresia melanomului. TME joacă un rol cheie în dezvoltarea melanomului, deoarece celulele imune, fibroblastele și macrofagele pot inhiba inițial creșterea tumorii, dar pot susține ulterior supraviețuirea, invazia și metastazarea tumorii prin secreția factorilor pro-tumorigeni. În plus, vascularizarea tumorilor, determinată de angiogeneză este influențată de aceste celule, prin factori ca VEGF-C ce favorizează metastazele și evadarea imunologică. Studii recente evidențiază importanța diferitelor componente TME, cum ar fi mastocitele, care contribuie la progresia tumorii prin eliberarea de mediatori pro-angiogeni și imunoinhibitori, susținând în continuare relația complexă dintre celulele melanomului și micromediul său.

## **Studiul 2: Hibridizarea fluorescentă in situ (FISH) în diagnosticul melanomului – avantaje și dezavantaje.**

S-a stabilit diagnosticul FISH cu ajutorul criteriilor furnizate de Abbott Molecular pentru kitul de melanom Vysis. În primul rând, s-au numărat semnalele din fiecare dintre cei 30 de nuclei pentru RREB1, MYB, CCND1 și CEP6. S-a observat o sumă de 242 de semnale pentru RREB1 într-un melanom. De asemenea, s-a calculat media semnalelor pentru fiecare dintre cele patru sonde și pentru fiecare caz, iar cea mai mare medie a semnalelor a fost observată pentru RREB1 (183,55 semnale/caz). Cea mai mică medie a semnalelor a fost întâlnită pentru CEP6, cu 169 semnale/caz. Apoi s-a calculat numărul și procentul nucleilor RREB1 anormali. Cel mai mare procent de nuclei anormali a fost întâlnit în melanoame. Nu au fost rezultate FISH+ pentru RREB1 (6p25), deși în literatura de specialitate se afirmă că RREB1 are un rol foarte important în tumorigeneza melanomului și este unul dintre cele mai sensibile criterii întâlnite în leziunile melanocitare analizate cu testul FISH.

Referitor la suma și media semnalelor MYB și CCND1, cea mai mare sumă de semnale a fost găsită în melanoame. Cel mai mic număr de semnale a fost găsit în doi nevi atipici joncțional, cu 156 de semnale atât pentru MYB, cât și pentru CCND1. Pentru a avea un diagnostic pozitiv de melanom trebuie să existe o medie a semnalelor CCND1 sau MYB per nucleu  $\geq 2,5$ , iar aceste rezultate s-au obținut doar pentru CCND1 pentru cazurile 3 (2,53 semnale/nucleu) și 9 (2,56 semnale/nucleu). Spre deosebire de studiul nostru, în care doar cazurile FISH pozitive au avut modificări în ceea ce privește CCND1 (11q23), în alte studii majoritatea cazurilor au fost testate pozitiv din cauza unei anomalii în cromozomul 6, în timp ce sonda pentru CCND1 nu a jucat un rol semnificativ.

Cu privire la rezultatele FISH pozitive/negative, după analiza leziunilor melanocitare, doar o leziune benignă din toți nevii studiați a avut un diagnostic FISH pozitiv. Melanomul cu testul FISH pozitiv s-a datorat unei medii a semnalelor CCND1 de  $> 2,5$  semnale / nucleu, 2,53 semnale, ceea ce ar putea însemna că au existat unele anomalii cromozomiale găsite în regiunea 11q23 a cromozomului 11. Conform unui studiu recent, există un număr mare de rezultate fals-negative FISH în literatura de specialitate, de exemplu, Kerl și colab. au găsit o rată fals negativă de 30,7% folosind criteriile Abbott. În cazul nostru, rata fals negativă a fost de 80% (4 din 5 melanoame au avut un rezultat FISH negativ), în timp ce procentul fals pozitiv pentru testele FISH pozitive a fost de 7,69%. Dintre leziunile benigne, una dintre ele (5,55% dintre leziuni) a avut un rezultat FISH pozitiv, privind semnalele CCND1 (verde) cu peste 2,5 semnale/nucleu (2,56 semnale).

De asemenea, s-au efectuat corelații histopatologice FISH pentru cazurile cu rezultate ambigue la testul FISH. Unele studii arată că s-a demonstrat că FISH distinge nevii activi mitotic de melanomul nevoid. În studiul nostru, niciunul dintre nevi nu avea mitoze ce ar fi putut ajuta la stabilirea diagnosticului FISH. Cu toate acestea, au existat 2 melanoame cu mitoze ce au fost diagnosticate ca

FISH negative. S-a analizat grosimea tumorii, embolii, gradarea tumorilor, infiltratul celular și prezența pigmentului. Niciuna dintre tumori nu a avut emboli prezenți, deși studiul a avut 5 melanoame, dintre care unul a avut un rezultat pozitiv FISH. S-a analizat grosimea tumorală pentru aceste leziuni, deoarece supraviețuirea este strâns legată de aceasta (indicele Breslow). În ceea ce privește gradul de diferențiere al lotului cu rezultate FISH ambigue (cu rezultate FISH fals negative sau fals pozitive), s-a observat doar o diferențiere de tip G1 (bine diferențiată) pentru 5 din 8 tumori (una dintre ele fiind un melanom nodular) și 3 tumori cu un grad moderat de diferențiere G2. S-a constatat că testul FISH este un instrument valoros, dar din cauza numărului mare de rezultate fals negative, ar trebui utilizat împreună cu alte tehnici de diagnostic (examenul histopatologic) sau în scopuri științifice.

### **Studiul 3: Aspecte fenotipice ale tumorilor melanocitare. Metode standard de diagnostic în nevi și melanom.**

#### **Studiul 3.1: Similaritățile dintre nevii atipici și melanom**

Cele mai specifice criterii de melanom ale studiului au inclus vase polimorfe, structuri gri/albastre, zone excentrice fără structură, puncte/globuli negre/i periferice, urmate de linii albe, linii groase reticulare/ramificate și linii angulare. La nevii atipici, liniile albe au fost mai puțin frecvente, similar unui studiu al lui Verzi și colab., care a raportat că liniile albe sunt mai specifice melanoamelor; 31 din 144 de melanoame au prezentat linii albe (22%). Recent, indiciul liniilor angulare a fost adăugat algoritmului original „Chaos & clues” de Jaimes et al., deoarece consideră că este o caracteristică specifică a melanoamelor plate pe pielea deteriorată cronic de soare.

În cazul regulii ABCDE, în urma analizei statistice, s-au obținut următoarele - s-a demonstrat o asociere statistică semnificativă între 95-99% pentru elementele analizate, după cum urmează: s-a analizat asocierea dintre melanom și rezultatul obținut la examenul histopatologic (EHP), obținând o valoare  $p$  ce indică o asociere semnificativ statistică de 99% între criteriile menționate. Ulterior, s-a analizat asocierea dintre prezența melanomului și fiecare dintre criteriile regulii ABCDE (A - asimetrie, B (border) - contur, C - culori, D - diametru, E – evoluție), obținând următoarele rezultate: 4 dintre cele 5 criterii au prezentat o asociere semnificativ statistică între acestea și melanom de 99%. Analiza statistică confirmă utilitatea regulii ABCDE în diagnosticul melanomului, dar și al nevilor atipici, această tehnică putând fi utilizată și de către pacient pentru auto-examinare. Similar cu rezultatele obținute în acest studiu, potrivit lui Rezzé et al., „regula ABCDE” poate fi utilă în diagnosticul clinic al nevilor atipici. Din punct de vedere clinic, studiul a arătat că toți nevii atipici biopsiați au avut criteriul „E” (evoluție) al „regulii ABCDE”, ceea ce subliniază importanța examinării periodice clinice și dermatoscopice a acestor leziuni. În cazul melanoamelor, toate criteriile ABCDE au fost întâlnite, mai puțin într-un caz ce prezenta toate criteriile ABCDE, dar cu un diametru de sub 6 mm.

#### **Studiul 3.2 – Utilitatea dermatoscopiei ca și metodă de diagnostic a tumorilor melanocitare**

În ceea ce privește rezultatele studiului, pentru a analiza leziunile, au fost utilizate algoritmele “7-point checklist” și “pattern analysis”. S-a descoperit că algoritmul “7-point checklist” este un instrument foarte util pentru a distinge între nevi și melanom, deoarece majoritatea nevilor analizați (169 din 190 nevi) aveau sub 3 puncte (tumori benigne / nevi), în timp ce majoritatea melanoamelor confirmate histopatologic (8 din 10 melanoame) aveau  $\geq 3$  puncte (tumori maligne / melanom). Într-un studiu realizat de Schweizer et al., algoritmul “7-point checklist” a avut o precizie de 63,9-83,6%, fiind al doilea cel mai potrivit după regula ABCDE. S-a constatat că algoritmul de analiză a modelelor (pattern analysis) este un instrument important în clasificarea nevilor, ce atrage atenția și asupra morfologiei atipice a unor leziuni, în special a celor ce au avut două (46,31%) sau trei modele (4,21%).

În ceea ce privește *estimarea grosimii tumorale*, pentru melanoamele studiate s-au folosit culori dermatoscopice și criterii specifice, comparând rezultatele cu examenul histopatologic. Evaluarea dermatoscopică a culorilor nu a fost un criteriu foarte precis pentru acest studiu, deoarece nu a ajutat la stabilirea adâncimii exacte a tumorilor; de exemplu, unul dintre SSM-urile analizate avea culori albastre, ceea ce înseamnă melanină localizată în dermul profund, dar tumora avea un indice Breslow confirmat histopatologic de 0,5 mm (deși poate varia în funcție de situsul examinat al tumorii, de experiența și cunoștințele patologului). Studiul nostru a arătat că dermatoscopia poate să nu fie un

instrument foarte precis pentru evaluarea grosimii tumorale, dar, în general, poate ajuta la orientarea clinicianului în luarea deciziei terapeutice corecte.

Unele dintre cele mai întâlnite criterii dermatoscopice în melanoamele studiate au fost: poligoane (75% - LMM, 40% - SSM), linii albe strălucitoare (100% în LMM, 40% - SSM), vâlul albastru-alb (60% - SSM, 75% - LMM), structuri de regresie (80% - SSM, 100% - LMM), rozete (40% - SSM, 50% - LMM) și zone hiperpigmentate neregulate (60% - SSM, 100% - LMM). Un studiu realizat de González-Álvarez et al. afirmă că rozetele pot fi un indicator al melanoamelor incipiente, iar acest lucru poate fi corect, deoarece una dintre tumorile studiate care aveau rozete avea un IB de 0,37 mm. Vâlul alb-albastru și structurile de regresie au fost unele dintre cele mai întâlnite structuri dermatoscopice specifice melanomului. Într-un studiu realizat de Martins da Silva, vâlul albastru-alb se găsește mai ales în melanoamele invazive.

#### **Studiul 4: Cauzele apariției melanomului. Nevogeneză versus melanomogeneză.**

Melanomul este un cancer de piele cu o patogeneză foarte complexă, cauzată de mecanisme moleculare și genetice care nu sunt încă pe deplin înțelese și este unul dintre cancerele cu cele mai multe mutații somatice conform unui studiu realizat de Alexandrov et al. Expunerea la radiații UV intense, un număr mare de nevi, ereditatea, vârsta și pielea deschisă la culoare sunt unii dintre cei mai importanți factori de risc asociați cu incidența crescută a melanomului. Examinările clinicopatologice pentru diagnosticul melanomului trebuie integrate cu tehnici moleculare, pentru a crește acuratețea detectării melanomului și pentru a avea o mai bună înțelegere a patogenzei acestuia. Introducerea de noi tehnici pentru analizele genetice și moleculare poate duce la o mai bună înțelegere a patogenzei melanomului. Conform unui studiu realizat de Bastian et al., melanoamele pot fi clasificate în mai multe categorii biologice, ce diferă în ceea ce privește tipurile de celule de origine, prezentarea clinică/histologică, vârsta de debut, tipul de metastază, distribuția etnică / de gen a pacienților, rolul radiațiilor UV, procesele mutaționale. Ar trebui efectuate mai multe cercetări pentru a elucida relevanța clinică a anumitor mecanisme moleculare ale melanomului, pentru a îmbunătăți managementul clinic, strategiile preventive și prognosticul pacienților. Cauza exactă a melanomului nu este încă pe deplin înțeleasă, dar există numeroși factori care pot iniția și promova dezvoltarea acestuia: de la radiațiile ultraviolete (UV), factorii genetici, localizarea geografică, fototipul pielii, imunosupresia, infecțiile virale, un număr mare de nevi, stresul, factorii biologici / citologici până la gen. În ciuda progreselor recente în diagnosticul și tratamentul melanomului avansat, așa cum se menționează în unele studii, cea mai bună șansă de supraviețuire se bazează pe prevenire / detectare precoce.

## **CONCLUZII**

Melanomul este o formă agresivă de cancer cutanat ce se poate dezvolta spontan (de novo) sau printr-o progresie liniară de la nevi comuni, atipici, sub influența unor factori cheie cauzali. Diagnosticat în stadii inițiale, melanomul este vindecabil, cu rate mari de supraviețuire, însă într-un stadiu avansat/metastatic prognosticul pacientului se înrăutățește. Orice leziune melanocitară ce s-a modificat în timp este necesar să fie verificată prin metode standard de diagnostic (examen clinic, dermatoscopic, histopatologic), dar și prin tehnici moderne, dacă nu se obține un diagnostic clar prin metodele obișnuite (de exemplu, FISH, CISH, CGH, etc.), metode moderne ce pot ajuta la stabilirea unui diagnostic cert și precoce.

Diagnosticul precoce al melanomului are cea mai mare importanță pentru prognosticul pacienților și există o nevoie constantă de instrumente de diagnostic îmbunătățite, ceea ce înseamnă că ar fi util să testăm toate posibilitățile ce pot ajuta pacientul să primească un diagnostic rapid și corect. Acest lucru a fost exemplificat și în rezultatele obținute în teza de doctorat. Conform studiului, dermatoscopia (s-a demonstrat importanța utilizării unor algoritme dermatoscopice precum 7-point checklist, Chaos & Clues, Pattern analysis, respectiv cel legat de regula ABCDE) și examenul histopatologic sunt metodele standard cele mai importante în diagnosticul melanomului, fapt demonstrat de rezultatele

obținute, însă foarte utilă s-a dovedit și tehnica FISH. Hibridizarea fluorescentă in situ (FISH) este un instrument ce oferă informații cu privire la duplicarea/amplificarea, ștergerea sau translocarea cromozomilor și poate fi utilizată în scopuri de diagnostic, prognostic, pentru prezicerea unui răspuns la o terapie sau pentru monitorizarea pacienților pentru a vedea dacă un tratament a avut succes. Pe baza studiului FISH efectuat, s-a constatat că această tehnică este o metodă valoroasă pentru a ajuta clinicianul să stabilească un diagnostic, dar ar fi de recomandat să fie utilizat ca tehnică complementară examenului histopatologic. Accentul studiului FISH a fost asupra anomaliilor cromozomale ce pot fi identificate în leziunile melanocitare și pe fiabilitatea hibridizării fluorescenței in situ în diagnosticul melanomului.

De asemenea, studiul a subliniat importanța micromediului tumoral, în special a mastocitelor, și efectul acestora asupra inițierii, progresiei și a metastazării melanomului, toate aceste aspecte fiind prezentate printr-o cercetare standard original și prin două articole tip review privind cele mai importante date din literatura de specialitate despre micromediul tumoral al melanomului și principalii factori cauzali ai acestuia (radiații UV, factori genetici, etc.). Înțelegerea interacțiunilor complexe dintre micromediul tumoral și melanom și impactul factorilor mutageni asupra progresiei melanomului este crucială pentru avansarea strategiilor terapeutice. Cercetările viitoare ar trebui să vizeze componente specifice TME pentru a dezvolta terapii antitumorale mai eficiente, îmbunătățind în cele din urmă tratamentul melanomului și prognosticul pacienților.

### **Contribuții personale**

- Studiul principalilor factori cauzali ai apariției nevilor, respectiv a melanomului prin intermediul realizării unui review al celor mai recente articole științifice referitoare la acest subiect.
- Analiza relației dintre nevi și melanom, a nevogenezei, dar și a modului de debut și patogeneza a melanomului (debut de novo/spontan versus melanom pe nevi preexistenți).
- Studiul micromediului tumoral, al implicației celulelor și al angiogenezei în apariția și progresia melanomului, elemente extrem de importante în furnizarea de informații legate de biologia/patogeneza melanomului, ce pot fi utile în managementul acestui neoplasm. Review-ul despre micromediul tumoral al melanomului evidențiază importanța explorării rolului complex al TME cu scopul de a descoperi abordări terapeutice inovatoare în managementul melanomului.
- Analiza utilității principalelor metode standard de diagnostic – dermatoscopie, examen histopatologic, precum și identificarea de noi modalități de utilizare ale acestora, spre exemplu, utilitatea dermatoscopiei în estimarea grosimii tumorale, element adjuvant în alegerea marginilor de siguranță în vederea exciziei leziunilor melanocitare.
- Testarea utilității diferitelor algoritme dermatoscopice în diagnosticul melanomului, și anume – Chaos & Clues, 7-Point checklist, Pattern Analysis.
- Determinarea utilității tehnicii FISH în diagnosticul melanomului, dar și al nevilor atipici, cu identificarea principalelor anomalii cromozomiale de la nivelul ADN-ului tumoral, tehnica hibridizării fluorescente in situ nefiind utilizată la scară largă în România, la momentul actual, pentru stabilirea diagnosticului melanomului, această tehnică realizându-se în premieră la laboratorul privat în cadrul căreia s-a realizat studiul.

**Direcții viitoare de cercetare** – Se dorește aprofundarea studiului legat de cauzele apariției melanomului, analiza importanței tehnicilor moleculare în diagnosticul melanomului, și continuarea studierii tehnicii hibridizării fluorescente in situ, cu scopul de a identifica noi informații legate de managementul melanomului pentru a aduce un beneficiu pacienților și pentru îmbunătățirea prognosticului acestora.