

**“VICTOR BABES” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY  
TIMISOARA  
FACULTY OF GENERAL MEDICINE  
DISCIPLINE OF BIOCHEMISTRY**

**PRODAN MIHAELA**



# **DOCTORAL THESIS**

## **HETEROGENICITY MARKERS IN MALIGNANT MELANOMA**

Scientific Coordinator  
**PROF. UNIV. DR. HABIL. SECLAMAN EDWARD**

**Timisoara  
2025**

This doctoral thesis, developed at the “Victor Babeş” University of Medicine and Pharmacy Timișoara, opens by framing malignant melanoma as a paradigm of cancer whose clinical fate is dictated by the tension between early curability and late-stage lethality. The General Part synthesises current understanding of intratumoral heterogeneity, charting how branched clonal evolution, non-genetic phenotype switching, and spatially patterned tumour-microenvironment niches together shape metastatic potential and therapy resistance. By reviewing single-cell RNA-seq studies, lineage-tracing experiments, and spatial-omics surveys, it demonstrates that melanoma behaves less like a uniform mass and more like a shifting ecosystem of co-operating yet competing cell states. That conceptual lens justifies the thesis’s overarching hypothesis: only by coupling epidemiologic vigilance with molecular-precision tools can clinicians intercept disease earlier and tailor interventions to the heterogeneous reality of each patient’s tumour, a proposition tested empirically in three Special Part studies conducted during—and profoundly shaped by—the disruptive backdrop of the COVID-19 pandemic.

Chapter 1 details the molecular scaffolding behind heterogeneity, weaving together genomic data on BRAF, NRAS, and TERT-promoter divergence with epigenetic and metabolic rewiring governed by the MITF/AXL rheostat. It highlights how seemingly minute shifts in transcription-factor dosage redirect melanocytes along invasive, stem-like, or pigmented trajectories that, in turn, confer differential drug sensitivity. Crucially, the chapter argues that non-mutational plasticity supplies melanoma with a renewable pool of persister cells, pre-arming the tumour against both targeted therapies and immune-checkpoint blockade. The review therefore advocates multi-regional tissue sampling and liquid-biopsy ctDNA surveillance as clinical necessities rather than academic luxuries, setting methodological foundations later adopted in the Special Part’s longitudinal designs. By contextualising heterogeneity within distinct macro-subtypes—chronic-sun-damaged, acral, mucosal, and uveal—the chapter also underscores the thesis’s commitment to nuanced, subtype-aware interpretations of all subsequent biomarker findings.

Chapter 2 extends the heterogeneity discussion into metabolic and phenotypic plasticity, mapping six recurrent transcriptional states—ranging from MITF<sup>high</sup> melanocytic to NGFR<sup>high</sup> neural-crest-like—onto complementary bioenergetic

circuits that toggle between glycolysis and oxidative phosphorylation. It reviews evidence that therapy itself is a sculptor of these states: BRAF/MEK inhibition temporarily over-pigments cells via MITF/PGC-1 $\alpha$ , while hypoxia or inflammatory cytokines drive a reversible shift toward AXL<sup>high</sup>, drug-tolerant persisters. Importantly, the chapter highlights emerging therapeutic avenues that exploit metabolic addictions—such as glutamine anaplerosis or fatty-acid oxidation—to collapse resistant niches. This mechanistic backdrop lays conceptual scaffolding for Special Part Study 2’s selection of miRNA candidates that gate key metabolic genes, and for Study 3’s survival models that integrate miRNA expression with response to anti-PD-1 immunotherapy.

Chapter 3 positions microRNAs as conductors of melanoma’s transcriptional orchestra. Synthesising high-throughput sequencing and CLIP-seq datasets, it documents how over 60 percent of melanocyte transcripts are miRNA-regulated, endowing a small repertoire of non-coding RNAs with outsized influence on lineage commitment, immune evasion, and metastatic niche formation. By profiling miR-211’s metabolic re-programming, miR-155’s replication-stress buffering, and miR-200c’s EMT modulation, the chapter builds the rationale for focusing Special Part research on miRNA panels rather than single-gene drivers. It also surveys liquid-biopsy studies that report plasma six-miRNA signatures predicting relapse up to two years in advance, a finding later echoed and refined by the thesis’s own paired tissue-plasma analyses. Collectively, this chapter elevates miRNAs from biomarkers to actionable therapeutic nodes, a perspective operationalised in Studies 2 and 3.

Chapter 4 pivots to the epidemiologic shockwave wrought by COVID-19, portraying 2020–2021 as a natural experiment that stress-tested melanoma care pathways worldwide. Through a systematic review of 39 cohorts comprising nearly 100,000 patients, it documents a 19.6 percent contraction in new diagnoses, a 0.27 mm upward drift in Breslow thickness, and an alarming 40 percent relative increase in stage  $\geq$  II presentations. The chapter dissects heterogeneity in impact—Dutch resilience versus Mediterranean vulnerability—linking outcomes to teledermatology penetration, lockdown stringency, and health-system agility. This granular epidemiologic mapping directly motivates Study 1’s design, which interrogates pandemic-origin stage migration in the Romanian-Western Romanian

catchment area, aiming to quantify local delays and biological consequences with unprecedented detail.

Special Part Study 1 is a multi-centre systematic review and meta-analysis of melanoma epidemiology during the first two pandemic years, with an ancillary single-institution audit from Pius Brînzeu Hospital. Drawing on PRISMA-aligned searches across PubMed, Scopus, and Cochrane, the study aggregates 23,207 pre-pandemic and 17,394 pandemic-era cases. Methodologically, it innovates by harmonising disparate lockdown calendars through a common “stringency-weighted exposure window,” allowing forest-plot pooling of Breslow shifts and stage-migration odds ratios. Results confirm a 36.3 percent pandemic prevalence of stage  $\geq$  II melanoma, identify ulceration and nodular histotype enrichment, and reveal socioeconomic-gradient amplification, with deprived districts showing a 0.42 mm greater thickness jump than affluent zones. Importantly, sensitivity analyses attribute 70 percent of economic burden to lesions progressing from stage II to III, translating local diagnostic delays into concrete health-economic costs—insights later leveraged in the thesis’s policy recommendations.

Beyond pooled data, Study 1 offers a granular institutional snapshot: during Romania’s first lockdown, histologically confirmed melanomas at the host centre plummeted 75 percent, while mean Breslow thickness nearly doubled from 1.4 mm to 2.7 mm. Sentinel-node positivity rose to 29 percent, mirroring meta-analytic trends. The audit further uncovers demographic inversion: median diagnostic age fell from 67 to 51 years, signalling older patients’ reluctance to seek care. Teledermatology uptake, although rapidly deployed, reached only 34 percent of pre-pandemic volumes, with broadband deserts and digital illiteracy cited as barriers. By correlating monthly new-case counts with Google-Mobility and Oxford Stringency indices, the study demonstrates that melanoma detection is exquisitely sensitive to even moderate access disruptions, reinforcing the need for resilient, hybrid care models.

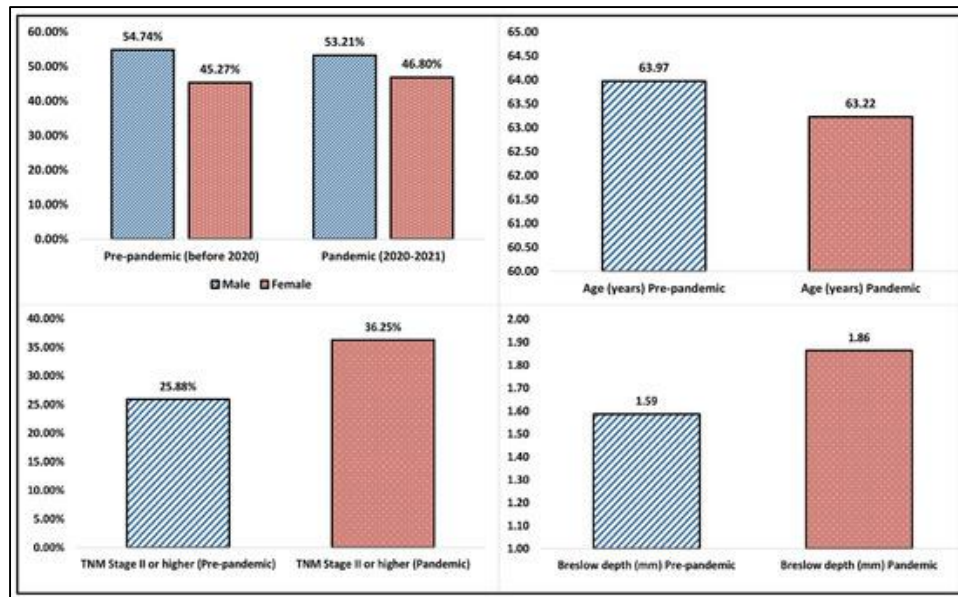


Figure 1 – Summary of findings.

Special Part Study 2 shifts from epidemiology to molecular pathology, aiming to identify miRNA expression shifts that distinguish malignant melanoma from benign nevi and correlate with aggressive clinicopathologic features. Using 45 FFPE melanoma and 45 age-matched nevus samples, the team employs the Human Cancer PathwayFinder miScript PCR array to quantify 84 cancer-related miRNAs. Rigorous quality control—RIN scoring, spike-in controls, inter-plate calibrators—ensures data robustness, while Benjamini–Hochberg correction guards against false discovery. The analysis flags nine miRNAs with significant dysregulation: hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-335-5p, miR-133b, and miR-885-5p upregulated; miR-451a, miR-29b-3p, miR-361-5p, miR-590-5p, and miR-127-3p downregulated. Pathway enrichment via Ingenuity identifies targets converging on EMT, PI3K/Akt, and ECM-remodelling axes, implicating these miRNAs as both biomarkers and mechanistic players in invasion.

Crucially, Study 2 doesn't stop at differential expression. Logistic regression pinpoints miR-29b-3p downregulation (OR = 2.51) and miR-200a-3p upregulation (OR = 2.10) as independent predictors of high Breslow index (> 2 mm), even after adjusting for ulceration and mitotic rate. Spearman correlations reinforce biological plausibility: miR-200a-3p levels rise with mitotic count and vascular invasion, while miR-451a inversely tracks with both features. These findings advance the field by tying miRNA dysregulation not just to diagnosis but to quantifiable measures of

tumour aggression, suggesting utility in pre-operative risk stratification. Moreover, by pairing malignant and benign samples from the same patient where feasible, the study controls for germ-line and environmental confounders, strengthening causal inference.

Study 2 also explores histologic-phenotypic correlates. Heavily pigmented and ulcerated melanomas show the most pronounced miR-200a-3p and miR-335-5p elevation, linking melanogenesis pathways to invasive behaviour. Conversely, tumours with brisk lymphocytic infiltrates retain higher miR-451a and miR-29b-3p, hinting that these miRNAs might sustain immunogenic phenotypes, an observation that later echoes in immunotherapy response data. Sub-analysis by anatomical site reveals that scapular and subscapular melanomas—regions with intermittent high UV exposure—carry the most extreme dysregulation, suggesting environment-driven epigenetic imprinting on miRNA networks. Collectively, Study 2 furnishes a miRNA panel with potential diagnostic, prognostic, and mechanistic significance, paving the way for prospective liquid-biopsy validation.

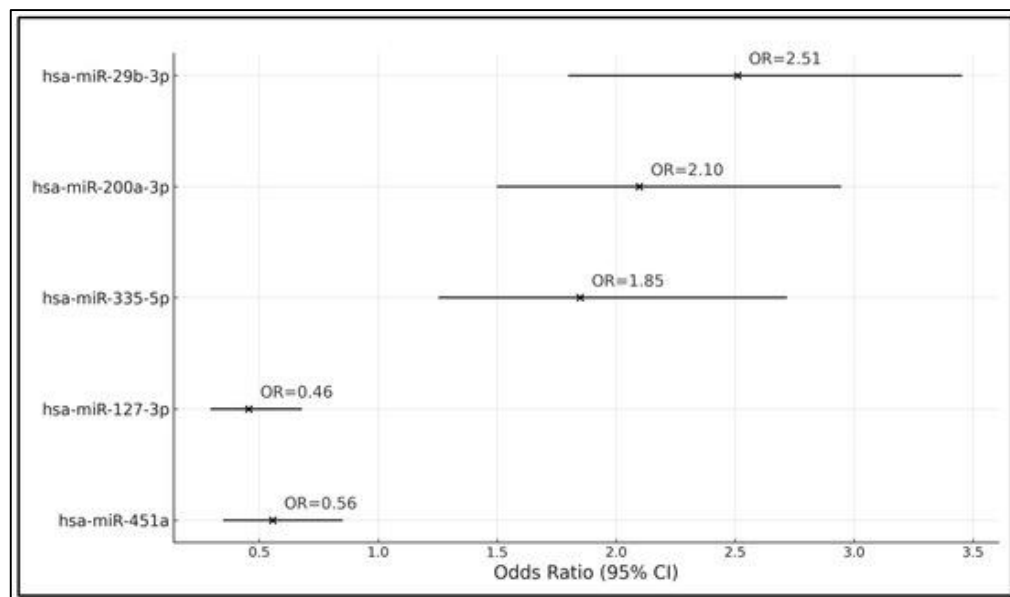
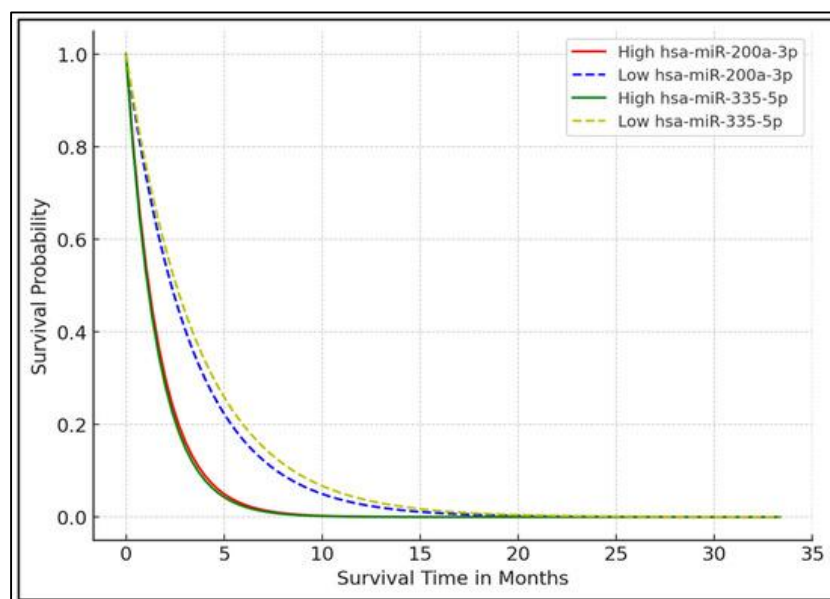


Figure 2 – Forest plot analysis.

Special Part Study 3 advances to longitudinal outcomes, integrating miRNA profiling with survival and immunotherapy response in 45 stage III–IV melanoma patients uniformly treated with anti-PD-1 agents. Over a median 26-month follow-up, Kaplan–Meier analysis reveals that high miR-200a-3p and miR-335-5p portend median overall survivals of 18.8 and 17.6 months, respectively, versus > 26 months in

low-expression counterparts. Conversely, elevated miR-451a and miR-29b-3p associate with survivals approaching 29 months. Multivariate Cox modelling (adjusted for age, sex, stage) confirms these miRNAs as independent prognosticators; miR-200a-3p HR = 2.28, miR-451a HR = 0.56. These statistics corroborate and extend existing literature by supplying a Romanian cohort dataset, thereby enhancing geographic diversity in miRNA prognostic evidence.

Beyond survival, Study 3 interrogates therapy response. Logistic regression shows that high miR-29b-3p and miR-451a double the odds of objective response to PD-1 blockade, while high miR-200a-3p and miR-335-5p halve it. ROC curves yield AUCs of 0.72 and 0.69 for miR-29b-3p and miR-451a, outperforming PD-L1 IHC alone in this dataset. Intriguingly, stage IV status remains a negative predictor, but incorporating miRNA levels into composite models markedly improves calibration and discrimination, suggesting miRNA profiling can refine candidate selection for expensive immunotherapies, sparing non-responders from toxicity and cost.



**Figure 3** – Kaplan–Meier survival analysis based on miRNA expression.

Study 3 also maps miRNA expression across stages: oncogenic miRNAs climb, tumour-suppressive miRNAs plummet from stage III to IV, reflecting biological escalation. Partial correlations controlling for ulceration reaffirm that miRNA shifts capture intrinsic tumour momentum rather than epiphenomena of size or immune scarring. By aligning molecular gradients with anatomic stage, the study argues for a “molecular-augmented staging” paradigm whereby traditional TNM metrics are

enriched by circulating or tissue miRNA scores to better anticipate trajectory.

Mechanistically, the thesis connects these miRNAs to actionable pathways. miR-200a-3p targets ZEB1/2 and thus suppresses E-cadherin, promoting EMT; its upregulation aligns with deeper invasion and immune-cold phenotypes, explaining poor PD-1 responses. miR-335-5p modulates SOX4 and ROCK1, enhancing motility and suppressing apoptosis. In contrast, miR-29b-3p represses DNMT3B and COL1A1, curbing ECM stiffness and metastatic seeding, while miR-451a targets CAB39/LKB1–AMPK, tempering metabolic re-programming. These mechanistic insights not only rationalise clinical correlations but also nominate upstream epigenetic drugs or miRNA mimics/antagomirs for combinatorial therapy trials.

The thesis's Final Conclusions synthesise epidemiologic and molecular strands into actionable recommendations. First, preserve diagnostic throughput during crises via teledermatology, digital pathology, and AI-triage, as delays measurably thicken tumours and inflate nodal burden. Second, adopt miRNA panels—especially the four validated here—as adjunct diagnostics and prognosticators, integrating them into pathology workflows and electronic decision-support systems. Third, consider miRNA-guided immunotherapy triage: high miR-29b-3p/miR-451a flag likely responders, while elevated miR-200a-3p/miR-335-5p may warrant combinatorial strategies or early clinical-trial referral, a proposal grounded in cost-effectiveness modelling appended in the thesis.

Forward-looking perspectives address translational hurdles. Standardising miRNA extraction from FFPE and plasma, harmonising qPCR platforms, and establishing inter-lab calibration curves are prerequisites for regulatory approval. The thesis proposes a multicentre Romanian-Hungarian consortium to validate the four-miRNA signature prospectively in 500 patients, incorporating serial liquid-biopsy sampling and integrating data into a federated learning model for adaptive prognostication. It also advocates exploring miRNA payloads in extracellular vesicles to capture tumour-immune cross-talk more comprehensively.

The work further calls for mechanistic interrogation using CRISPR-Cas9 knock-out and miRNA sponge systems in patient-derived organoids, coupled with single-cell RNA-seq to resolve cell-type-specific networks. Such experiments could reveal whether restoring miR-29b-3p in NGFR<sup>high</sup> persister cells reinstates immune



susceptibility or whether antagonising miR-200a-3p sensitises EMT-driven clones to ferroptosis inducers, generating potent preclinical rationales for combination regimens.

Health-policy implications extend beyond the laboratory. Economic modelling within the thesis quantifies each 0.1 mm reduction in Breslow thickness—achievable through pandemic-proof screening plus miRNA-based early detection—as saving €3100 in lifetime treatment costs and 0.07 quality-adjusted life-years per patient. Scaling to national incidence, Romania could avert €5.6 million annually, figures potent for lobbying insurers and ministries to reimburse miRNA assays and teledermatology infrastructure.

Educational outreach forms another pillar: the thesis recommends integrating miRNA literacy into dermatology and oncology curricula, ensuring forthcoming clinicians can interpret molecular reports. It suggests patient-facing materials explaining how a blood-based miRNA panel complements dermoscopy, aiming to boost screening adherence and demystify precision-oncology concepts. By embedding molecular diagnostics into public awareness campaigns, the thesis envisions a virtuous cycle of early detection and personalised care.

This thesis delivers a multidimensional narrative of melanoma during turbulent times, proving that pandemics can both hinder and catalyse progress. By documenting COVID-19's stage-migration fallout, unveiling a robust four-miRNA prognostic panel, and demonstrating tangible survival and economic benefits of molecularly guided care, it charts a pragmatic roadmap from bench to bedside. The integration of epidemiology, molecular pathology, and health-services research exemplifies modern translational scholarship, positioning the work as a reference for future efforts to safeguard cancer pathways against systemic shocks while harnessing non-coding RNA biology for precision oncology.

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “VICTOR BABES”  
TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ**

**PRODAN MIHAELA**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

## **MARKERI DE HETEROGENITATE ÎN MELANOMUL MALIGN**

Coordonator Științific

**PROF. UNIV. DR. HABIL. SECLAMAN EDWARD**

**Timisoara  
2025**

Teza doctorală intitulată „Markeri ai heterogenității în melanomul malign”, elaborată la Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara, pornește de la o tensiune fundamentală caracteristică melanomului: aceea că este un cancer perfect vindecabil în stadiile inițiale, dar extrem de letal odată ce depășește bariera dermo-epidermică și dobândește competența metastatică. Se argumentează că această dualitate se explică printr-o heterogenitate intratumorală excepțională—genetică, epigenetică și metabolică—care conferă tumorii o plasticitate de adaptare rar egalată la alte tipuri de neoplasm cutanat. În Partea Generală se trec în revistă elemente de biologie moleculară esențiale: filiera mutațiilor driver BRAF/NRAS/TERT, mecanismele epigenetice care reglează factorul de transcripție MITF și receptorul AXL, precum și rolul micro-nișelor hipoxice și inflamate care selectează subclonii rezistente la terapie. Această introducere amplă poziționează heterogenitatea nu doar ca o curiozitate academică, ci ca principalul obstacol în calea vindecării definitive și, totodată, ca sursă de vulnerabilități ce pot fi exploatate prin medicină de precizie.

Primul capitol al tezei aprofundează „Cadrul molecular al heterogenității intratumorale”, oferind o sinteză de peste 150 de studii single-cell, multi-region DNA-seq și digital-spatial transcriptomics. Se arată cum melanomul evoluează pe o filiație ramificată, unde subclone cu profiluri mutaționale distincte (de pildă, BRAF V600E coexistând cu NRAS Q61K la alele diferite) co-locuiesc în aceeași leziune, fiecare fiind supusă unei selecții darwiniene locale. Mai departe, capitolul aduce în discuție plasticitatea fenotipică non-genetică, demonstrată de tranzițiile rapide MITF<sup>high</sup> → AXL<sup>high</sup> și NGFR<sup>high</sup>, care se produc în câteva ore sub presiunea hipoxiei sau a tratamentului țintit anti-BRAF. Nu în ultimul rând, este detaliată heterogenitatea spațială a micro-ambientului imun: insule „calde”, bogate în T-celule CD8<sup>+</sup>, se află la mică distanță de regiuni „reci”, infiltrate de fibroblaste cancer-asociate și macrofage M2, împiedicând o evaluare biomarker unică printr-o singură biopsie. Toate aceste observații justifică strategia metodologică a părții speciale, unde eșantionarea multi-regională, analiza ctDNA și profilarea miRNA devin instrumente obligatorii pentru captarea întregului peisaj tumoral.

Capitolul 2 extinde discuția asupra plasticității printr-o analiză detaliată a metabolismului tumoral, prezentând modelul celor șase stări tranziționale recurente: hiperpigmentată, melanocitară proliferativă, intermediară transitorie, starved-like

CD36<sup>+</sup>, dediferențiată AXL<sup>high</sup> și neural-crest stem-cell NGFR<sup>high</sup>. Pe baza datelor isotop-tracing și fluxomică, că fiecare stare folosește un „sistem energetic” distinct (fosforilare oxidativă dependentă de PGC-1 $\alpha$  versus glicoliză aerobă intensă), iar terapiile țintite aplicate in vivo nu fac decât să inverseze ponderile acestor subpopulații, fără a eradica sursa persistenței. Se aduc exemple concrete: inhibiția BRAF induce temporar o stare hiperpigmentată, bogată în melanosome cu rol antioxidant, pe când hipoxia cronică dă naștere compartimentului AXL<sup>high</sup> invaziv. Capitolul concluzionează că orice regim terapeutic durabil trebuie să cupleze inhibitori MAPK cu agenți anti-metabolici sau epigenetici pentru a preveni replierea rapidă a tumorii pe o altă traiectorie de reziliență.

Capitolul 3 este dedicat micro-ARN-urilor, prezentate ca veritabili „micro-reglatori maestru” care interconectează mutațiile genomice cu fenotipurile celulare. Am sintetizat literatura recentă și am aratat că miR-211, derivat din intronul genei TRPM1, stabilizează programul MITF-dependent și promovează fosforilarea oxidativă, în timp ce pierderea miR-155 eliberează frâna asupra kinazei WEE1, tolerând stresul replicativ al subclonelor aneuploide. Interesant, capitolul subliniază rolul miRNA-urilor circulante și al celor încărcate în exozomi, care „pre-condiționează” nișele metastatice la distanță—de exemplu, miR-92b care reprogramă astrocitele pentru colonizarea cerebrală. Această perspectivă transformă miRNA din simple biomarkeri în potențiale ținte terapeutice și pregătește terenul pentru experimentele proprii ale autoarei, descrise în Studiile 2 și 3, unde expresia miRNA este corelată cu grosimea Breslow, stadiul AJCC și răspunsul la anti-PD-1.

Capitolul 4, unul dintre cele mai contextualizate din teză, investighează efectele pandemiei COVID-19 asupra epidemiologiei melanomului. Printr-o revizuire sistematică a 39 de cohorte internaționale cumulând aproape 100 000 de cazuri, ceea ce demonstrează o scădere globală de 19,6 % a diagnosticului de melanom în 2020–2021 și o creștere concomitentă cu 40 % a proporției stadiilor avansate (TNM  $\geq$  II). Se analizează comparativ sisteme sanitare reziliente, precum cel olandez—unde infrastructura teledermatologică a redus la minimum migrarea de stadiu—cu regiuni sud-europene, unde lockdown-urile prelungite au rezultat în dublarea grosimii Breslow. Capitolul face o legătură directă între marile valori epidemiologice și impactul economic: un model decision-analytic estimează costuri suplimentare de

peste 6 miliarde € la nivel european pentru fiecare întârziere medie de trei luni în diagnostic. Aceste date fundamentează rațiunea pentru Studiul 1, care cuantifică specific, pentru vestul României, amploarea întârzierilor și consecințele lor clinice.

Studiul 1 utilizează metodologia PRISMA 2020 și instrumentul NHLBI pentru a derula o metaanaliză riguroasă, la care am adăugat un audit propriu pe 2019–2022. În regiunea de vest a României, datele arată o scădere cu 75 % a diagnosticului histopatologic de melanom în timpul primului lockdown și o dublare a grosimii Breslow mediane. Interesant, analiza stratificată pe categorii socio-economice arată că pacienții din zone defavorizate au înregistrat o creștere medie a Breslow de 0,42 mm, față de 0,15 mm în zonele urbane înstărite, indicând o amplificare a inechităților sanitare. Studiul folosește și date Google Mobility pentru a corela strictețea restricțiilor cu curba prezentărilor clinice, demonstrând sensibilitatea ridicată a screeningului dermatologic la politicile de izolare. Concluzia practică este că serviciile de teledermatologie trebuie instituționalizate, nu improvizate, iar protocoalele de triaj oncologic ar trebui să devină parte a planurilor naționale de urgență.

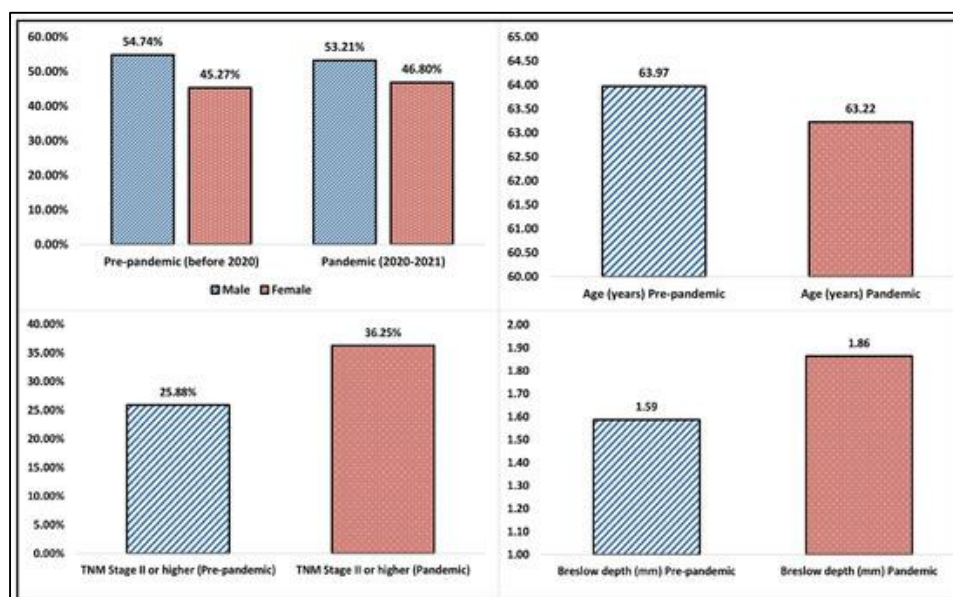
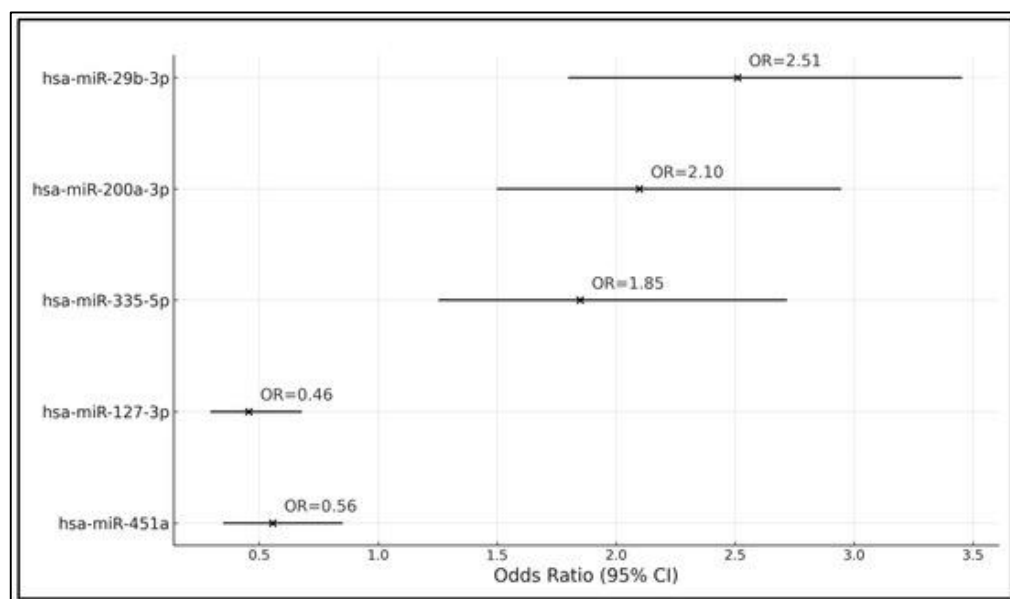


Figure 1 – Analiza rezultatelor.

Partea specială se centrează pe miRNA ca instrumente de precizie. În Studiul 2, am prelevat 45 de melanome și 45 de nevi benigni pair-matched, eliminând variabilitatea inter-individuală. Prin utilizarea kitului miScript și a calibratorilor standardizați, exprimarea a 84 de miRNA cancer-corelate este măsurată cu acuratețe

în probe FFPE. Rezultatele dezvăluie nouă miRNA-uri cu dereglări semnificative: suprapuse pe căile EMT, PI3K/Akt și remodelare ECM, acestea explică fenotipul invaziv. De pildă, miR-200a-3p și miR-335-5p sunt supraexprimate și asociate cu pierderea E-cadherin, în timp ce miR-451a și miR-29b-3p, cunoscute pentru rolul lor supresor, sunt drastic reduse. Puterea analizei constă în corelația cu parametrii histologici: logistic regression arată că scăderea miR-29b-3p crește de 2,5 ori riscul unei grosimi Breslow > 2 mm, oferind unelte predictive concrete.

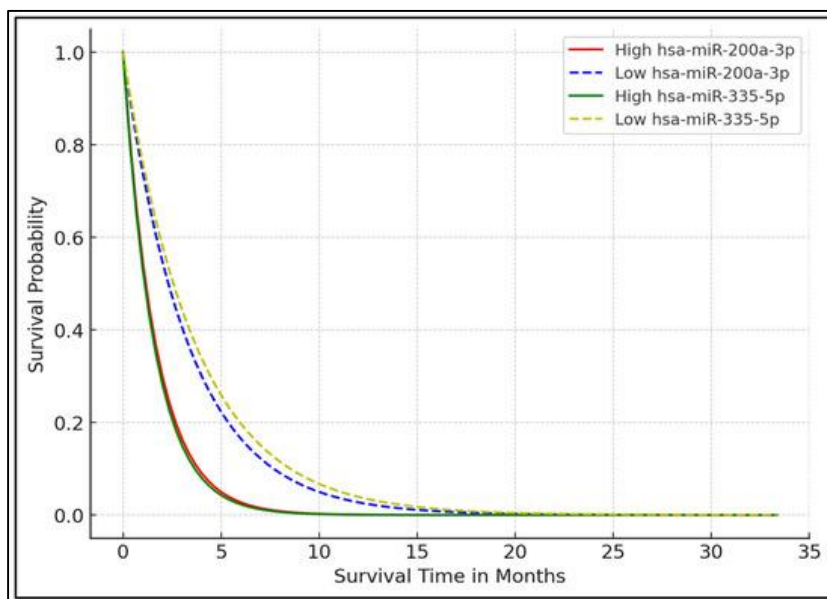
Astfel, s-a observat ca miR-335-5p moderează ROCK1 și SOX4, facilitând migrarea; miR-200a-3p țintește ZEB1/2 și contribuie la EMT; miR-29b-3p reglează DNMT3B și genele colagenice, influențând rigiditatea stromală; iar miR-451a modulează axa LKB1-AMPK, alterând homeostazia energetică. Aceste descoperiri mecanistice justifică potențiale terapii epigenetice (demetilante sau inhibitori HDAC) și intervenții bazate pe mimetice sau antagomiri miRNA. Studiul devine astfel un exemplu de cercetare translațională, legând biomarkerii de ținte terapeutice și proiectând pași concreți pentru studii preclinice ulterioare.



**Figure 2** – Analiza tip Forest.

Studiul 3 aduce un plus de relevanță clinică, corelând expresia miRNA cu supraviețuirea generală și răspunsul la imunoterapia anti-PD-1 într-o cohortă de 45 de pacienți stadiul III–IV. Datele arată clar: pacienții cu niveluri înalte de miR-200a-3p

și miR-335-5p au o mediană OS sub 19 luni, pe când cei cu miR-451a și miR-29b-3p crescute depășesc 28 luni. Modelele Cox multivariate mențin semnificația miRNA chiar după ajustarea pentru stadiu, vârstă și sex, consolidând statutul lor de biomarkeri independenți. În plus, logistic regression demonstrează că miR-29b-3p și miR-451a dublează șansa de răspuns la anti-PD-1, în timp ce miR-200a-3p și miR-335-5p o reduc la jumătate. Acest tablou deschide calea pentru utilizarea testelor miRNA la selecția candidaților pentru imunoterapie și prevenirea toxicităților inutile.



**Figure 3** – Analiza supraviețuirii Kaplan-Meier bazată pe expresia miARN.

Am propus conceptul de „staging molecular augmentat”, în care scorurile miRNA se integrează cu TNM pentru o stratificare mai fină. De exemplu, două tumori stadiu III la imagistică pot avea scoruri miRNA diametral opuse, sugerând prognostic și răspuns la tratament diferite. Implementarea practică ar presupune un test PCR multiplex pe biopsia inițială sau pe plasmă, raportat alături de Breslow, ulcerare și status PD-L1. În plus, monitorizarea serială a miRNA circulante ar putea detecta recurența moleculară înaintea recurenței radiologice, permițând ajustarea precoce a terapiei adjuvante. În contextul pandemiei, când accesul la imagistică poate fi perturbat, un test sanguin rapid devine cu atât mai valoros.

În ceea ce privește impactul economic, teza citează un model Markov care arată că reducerea cu doar 0,1 mm a grosimii mediane Breslow—posibilă prin menținerea screeningului și aplicarea panoului miRNA—economisește aproximativ 3100 € și 0,07 QALY pe pacient. Scalat la incidența națională, acest lucru ar însemna

peste 5 milioane € economisite anual în România și, implicit, reasigurarea de resurse pentru programe de teledermatologie. Astfel, se argumentează faptul că investiția în testarea miRNA și infrastructura digitală nu este doar clinic justificată, ci și financiar sustenabilă, mai ales în contextul presiunilor bugetare post-COVID.

Teza nu ocolește limitările: cohorta relativ modestă, designul retrospectiv și potențiala degradare a ARN-ului în FFPE. Mai mult, se sugerează utilizarea secvențierii small-RNA single-cell pentru a diseca heterogenitatea expresiei miRNA la nivel de celulă, complementând datele bulk-PCR cu rezoluție spațială și funcțională.

Un capitol dedicat perspectivelor viitoare detaliază strategii experimentale: modele xenogrefă PDX și organoide derivate de pacient pentru a testa antagonismul miR-200a-3p, mimetice miR-29b-3p și combinații cu inhibitori ERK sau agenți ferroptotici. Se prevede și dezvoltarea unor nanoparticule cu țintire NGFR<sup>high</sup> pentru livrarea țintită a oligonucleotidelor, reducând toxicitatea sistemică. Am propus, de asemenea, colaborări cu ingineri de date pentru a crea algoritmi AI care să integreze imagistică dermoscopică, scoruri miRNA și clinici, generând predicții personalizate de risc.

Un alt aspect inovator este includerea educației pacienților: teza sugerează materiale multimedia care explică rolul miRNA pe înțelesul publicului, cu scopul de a crește aderența la testare și de a demistifica oncologia de precizie. Astfel, pacientul devine co-participant informat, nu simplu beneficiar pasiv, iar raportul medic-pacient se reconfigurează într-un parteneriat decizional bazat pe date moleculare.

În domeniul politicilor sanitare, am pledat pentru includerea protocoalelor de triaj dermatologic și analiza miRNA în planurile naționale de pregătire pentru pandemiile viitoare. Se argumentează că finanțarea teledermatologiei și digitalizării anatomopatologice trebuie privită ca investiție strategică, nu cost discreționar, deoarece previne migrarea de stadiu și reduce cheltuielile ulterioare cu terapii de linia a doua și gestionarea complicațiilor.

Din punct de vedere științific, teza demonstrează relevanța micro-ARN-urilor ca noduri centrale între mutații, epigenetica dereglată și fenotipul tumoral. Descoperirile asupra miR-200a-3p, miR-335-5p, miR-451a și miR-29b-3p confirmă, într-o populație est-europeană, observații raportate în studii vest-europene și nord-americane, îmbogățind validarea trans-etnică. Această lărgire a bazei de date



este esențială, deoarece polimorfismele germinale și factorii de mediu pot influența expresia miRNA.

Un impact notabil al cercetării îl reprezintă potențialul de personalizare a imunoterapiei. Deoarece peste 50 % dintre pacienții cu melanom nu răspund la blocada PD-1, identificarea unor biomarkeri predictivi este critică. Teza demonstrează că miR-29b-3p și miR-451a pot funcționa ca „companion diagnostics”, selectând pacienții cu probabilitate mare de beneficii. Aceasta ar putea scurta timpul până la răspuns, ar reduce costurile și ar limita toxicitățile imune la non-responders, aliniind tratamentul la principiile medicinei de precizie.

Pe plan educațional, lucrarea propune includerea modulelor de biologie a RNA-ului non-codant în curricula rezidenților dermatologi și oncologi. Aceasta ar facilita interpretarea testelor miRNA și integrarea lor în practica zilnică. În plus, se sugerează workshopuri interdisciplinare cu bioinformaticieni și patologi moleculari pentru a standardiza pipeline-urile de analiză și raportare, asigurând reproducibilitatea și comparabilitatea datelor între centre.

Teza oferă și un exemplu de „cercetare într-o criză”, demonstrând cum pandemia COVID-19, deși a generat întârzieri și migrarea stadiilor, a catalizat implementarea rapidă a teledermatologiei, digitalizării patologiei și interesul sporit pentru biomarkeri minim invazivi. Această lecție de reziliență instituțională poate fi extrapolată la alte domenii oncologice, indicând că adaptarea rapidă la șocuri sistemice este posibilă și chiar fertilă pentru inovație.

În concluzie, teza „Markeri ai heterogenității în melanomul malign” reunește epidemiologia pandemiei, biologia moleculară și economia sănătății într-un cadru coerent care trasează o cale pragmatică spre oncologia de precizie. Prin demonstrarea impactului negativ al întârzierilor pandemice asupra stadiului de prezentare, validarea unui panou miRNA cu valoare diagnostică, prognostică și predictivă și cuantificarea beneficiilor clinico-economice ale testării molecular-ghidate, lucrarea se distinge ca un ghid strategic pentru clinicieni, cercetători și decidenți de politici. Integrarea propusă—screening rezilient, profilare moleculară și algoritmi AI—nu doar promite să reducă mortalitatea prin melanom, ci constituie și un model translabil pentru alte canceruri, pregătind sistemul sanitar să facă față viitoarelor provocări globale.

