
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Caracteristici histopatologice și markeri serici în melanom

Doctorand **Alina Florentina Letcă**

Conducător de doctorat **Prof.dr. Rodica Cosgarea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
--------------------	----

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Markeri de țesut tumoral	17
1.1. Markeri histopatologici	17
1.2. Markeri imunohistochimici	23
1.3. Markeri moleculari	31
1.3.1. Markeri genomici	31
1.3.2. Markeri epigenomici	33
2. Markeri serici	35
2.1. Proteine serice	35
2.2. Markeri moleculari serici	41
3. Markeri pentru răspunsul la tratament	44

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru/obiective	49
2. Metodologie generală	50
3. Studiul 1 - Rolul vitaminei D, citokinelor și al unor caracteristici clinico-patologice în progresia melanomului	51
3.1. Introducere	51
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	52
3.3. Material și metodă	52
3.4. Rezultate	54
3.5. Discuții	66
3.6. Concluzii	69
4. Studiul 2 - Rolul regresiei histologice în melanom. Supraviețuirea globală la pacienții cu melanom	71
4.1. Introducere	71
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	73
4.3. Material și metodă	74
4.4. Rezultate	75
4.5. Discuții	97

4.6. Concluzii	99
5. Studiul 3 - Rolul polimorfismelor genei receptorului vitaminei D în melanom	101
5.1. Introducere	101
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	103
5.3. Material și metodă	104
5.4. Rezultate	106
5.5. Discuții	114
5.6. Concluzii	115
6. Concluzii generale	117
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	119
REFERINȚE	121
ANEXE	137

Cuvinte cheie: melanom, caracteristici histopatologice, markeri serici, polimorfisme, citokine, vitamina D, regresia histologică

INTRODUCERE

Melanomul reprezintă cea mai agresivă formă de cancer cutanat, cu implicații importante asupra morbidității și mortalității. Incidența sa este în continuă creștere în întreaga lume, însă, intervențiile efectuate și tehnicile de diagnostic precoce au determinat creșterea frecvenței diagnosticării într-un stadiu incipient de boală. Diagnosticarea precoce, din păcate, nu garantează întotdeauna și evoluția favorabilă a bolii. Există pacienți la care tumorile primare sunt melanoame subțiri pentru care tratamentul chirurgical și excizia leziunii primare sunt suficiente pentru a asigura vindecarea bolii. Din aceeași categorie de pacienți cu melanoame subțiri, la unii boala progresează, determinând apariția metastazelor, chiar și după o perioadă lungă de timp din momentul exciziei. Există, de asemenea, pacienți care se prezintă mai tardiv la medic, atunci când grosimea tumorală a crescut semnificativ și boala posibil a metastazat deja. Acești pacienți necesită, pe lângă tratamentul chirurgical, și alte tratamente sistemice în încercarea de a controla boala și de a prelungi supraviețuirea. În ultimii ani s-au realizat progrese semnificative atât în sfera patogenezei melanomului, cât și în sfera tratamentului sistemic pentru cazurile avansate de boală, ce au determinat creșteri semnificative ale supraviețuirii pacienților afectați. În pofida acestor descoperiri, după o perioadă relativ stabilă, boala progresează din nou.

Aceste aspecte indică necesitatea identificării unor noi markeri care să fie ușor de determinat, prin tehnici minim invazive și să prezică evoluția bolii sau răspunsul la tratament mai repede și mai bine decât metodele imagistice disponibile momentan.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Caracteristicile histopatologice cu rol prognostic în melanom au fost studiate de mai bine de jumătate de secol. Cele care s-au dovedit a avea un rol în evoluția bolii la pacienții cu melanom sunt: grosimea tumorii (indicele Breslow), nivelul de invazie Clark, faza de creștere tumorală (radială vs. verticală), prezența ulcerăției, rata mitotică, prezența infiltratului inflamator limfocitar, prezența regresiei, invazia vasculară sau

limfatică și prezența metastazelor microsatelite. Un alt factor important pentru prognosticul pacienților cu melanom este prezența metastazelor ganglionare regionale.

Numeroase studii au analizat diverși **markeri imunohistochimici** în încercarea de a detecta anumite proteine care să prezică evoluția pacienților cu melanom, însă majoritatea studiilor au fost realizate pe un număr relativ mic de pacienți, iar majoritatea markerilor studiați nu și-au găsit încă aplicabilitate în practica clinică.

Markerii moleculari de țesut tumorali studiați au fost markeri genomici (mutații în genele BRAF, NRAS, KIT, etc) și markeri epigenomici (metilarea ADN și microARN-urile).

Markerii serici pot fi proteici (LDH, S100, MIA, citokine, vitamina D, etc.) sau moleculari (celule tumorale circulante, exozomii, acizi nucleici circulanți, micro-ARN-uri).

Unii dintre markerii serici utilizați pentru prognosticul și stadializarea pacienților cu melanom, și-au dovedit eficacitatea și ca **markeri predictivi pentru răspunsul la tratament**. Tratamentul sistemic în melanom a fost revoluționat în ultimii ani prin înțelegerea mai detaliată a mecanismelor patogenetice implicate în apariția tumorii, ceea ce a condus la identificarea noilor terapii, respectiv imunoterapia și terapia moleculară țintită.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul I a cuprins 2 părți. În prima parte s-a realizat analiza unor markeri serici: vitamina D, interleukina-6, interleukina-8 și interleukina-10 la pacienții cu melanom, iar în a doua parte s-au analizat caracteristici clinico-patologice în raport cu progresia bolii și apariția metastazelor, la pacienții cu melanom. Primul lot a inclus 41 de pacienți cu diagnosticul de melanom cutanat, confirmat histopatologic la care s-au determinat valorile serice ale vitaminei D și ale IL-6, IL-8 și IL-10 înainte de excizia tumorii primare. Pentru valorile serice obținute s-a încercat corelarea acestora cu stadiul sau progresia bolii, însă nu s-a obținut nici o corelație pozitivă. Al doilea lot a inclus 173 de pacienți cu melanom cutanat la care diagnosticul clinic de melanom a fost confirmat prin examinarea histopatologică după

efectuarea biopsiei excizionale. În analiza multivariată doar ganglionul sentinelă pozitiv și indicele Breslow mai mare de 2 mm au fost variabile independente asociate cu recurența bolii.

Studiul II a analizat rolul regresiei histologice și a altor caracteristici clinice și histopatologice pentru prognosticul și supraviețuirea pacienților cu melanom. A inclus 173 de pacienți cu melanom confirmat histopatologic la care s-a efectuat biopsia ganglionului sentinelă. Doar infiltratul inflamator limfocitar minim, ganglionul sentinelă pozitiv și indicele Breslow mai mare de 2 mm au prezentat valoare independentă pentru predicția mortalității. Regresia nu s-a asociat cu supraviețuirea globală.

Studiul III și-a propus să evalueze polimorfismele receptorului vitaminei D la pacienții cu melanom și să analizeze corelația dintre aceste polimorfisme și progresia melanomului. Au fost incluși în studiu 96 de pacienți cu diagnostic de melanom cutanat confirmat histopatologic, aflați în supravegherea Clinicii de Dermatologie Cluj. Pe baza informațiilor disponibile în literatură și pe baza semnificației lor din alte studii am selectat pentru analiză patru polimorfisme: unul mai studiat - rs731236 (TaqI) și trei mai puțin studiate: rs2239182, rs4760674 și rs7305032. În studiul de față nu a putut fi evidențiată nici o corelație între polimorfismele receptorului vitaminei D studiate (rs731236 sau TaqI, rs2239182, rs4760674, rs7305032) și alte elemente clinico-patologice cu rol cunoscut pentru prognosticul pacienților cu melanom cutanat.

Concluzii generale

Studiul de analiză a caracteristicilor clinico-patologice în raport cu progresia bolii și apariția metastazelor a identificat tipul histologic nodular de melanom, prezența ulcerăției, grosimea tumorală mai mare de 2 mm, infiltratul inflamator limfocitar minim și pozitivitatea ganglionului sentinelă ca factori prognostici pentru progresia bolii. Markerii serici analizați (vitamina D, IL-6, IL-8, IL-10) nu au putut fi corelați cu factorii prognostici histopatologici identificați, nici cu progresia bolii.

Prezența regresiei histologice la pacienții cu melanom a fost identificată ca factor favorizant, asociindu-se cu ganglionul sentinelă negativ, însă regresia nu a putut fi corelată cu progresia bolii. Caracteristicile histopatologice asociate semnificativ cu supraviețuirea globală au fost: grosimea tumorală mai mare de 2 mm, tipul histologic nodular de melanom, infiltratul inflamator limfocitar redus și ganglionul sentinelă pozitiv.

Studiul markerilor epigenici - polimorfismele receptorului vitaminei D - nu a putut evidenția o corelație între genotipul pacienților cu melanom pentru aceste polimorfisme și stadiul tumoral sau progresia bolii și apariția metastazelor, fiind necesare studii pe loturi mai mari în care genotipul pacienților să fie coroborat cu variațiile fenotipice ale vitaminei D din sângele periferic.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Studiul de analiză a caracteristicilor clinico-patologice a permis evidențierea rolului infiltratului inflamator limfocitar în progresia melanomului, acest aspect fiind descris de relativ puține studii până în prezent.

Evaluarea regresiei histologice în melanom a fost primul studiu de acest gen din țară, identificând rolul mai favorabil al regresiei histologice la pacienții cu melanom și contribuind la datele din literatură care susțin rolul grosimii tumorale crescute și a ganglionului sentinelă pozitiv ca principali factori de prognostic în melanom.

Studiul polimorfismelor genice este inovativ prin studierea unor polimorfisme puțin investigate până în prezent. Deși nu a permis evidențierea unor corelații semnificative statistic, acest studiu va fi continuat pe un număr mai mare de pacienți, în încercarea de a corela modificările genotipice cu variațiile fenotipice ale vitaminei D în vederea înțelegerii mecanismului ce stă la baza asocierii dintre vitamina D și melanom.

PHD THESIS SUMMARY

Histopathological characteristics and serum markers in melanoma

PhD Student **Alina Florentina Letcă**

PhD Supervisor **Prof.dr. Rodica Cosgarea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Markers of tumor tissue	17
1.1. Histopathological markers	17
1.2. Immunohistochemical markers	23
1.3. Molecular markers	31
1.3.1. Genomic markers	31
1.3.2. Epigenomic markers	33
2. Seric markers	35
2.1. Serum proteins	35
2.2. Serum molecular markers	41
3. Markers for treatment response	44
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis / objectives	49
2. General methodology	50
3. Study 1 - Role of vitamin D, cytokines and some clinico-pathological features in melanoma progression	51
3.1. Introduction	51
3.2. Working hypothesis / objectives	52
3.3. Material and method	52
3.4. Results	54
3.5. Discussions	66
3.6. Conclusions	69
4. Study 2 - The role of histological regression in melanoma. Overall survival in patients with melanoma	71
4.1. Introduction	71
4.2. Working hypothesis / objectives	73
4.3. Material and method	74
4.4. Results	75
4.5. Discussions	97

4.6. Conclusions	99
5. Study 3 - Role of vitamin D receptor gene polymorphisms in melanoma	101
5.1. Introduction	101
5.2. Working hypothesis / objectives	103
5.3. Material and method	104
5.4. Results	106
5.5. Discussions	114
5.6. Conclusions	115
6. General conclusions	117
7. Originality and innovative contributions of the thesis	119
REFERENCES	121
ANNEXES	137

Key words: melanoma, histopathological features, serum markers, polymorphisms, cytokines, vitamin D, histological regression

INTRODUCTION

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer, with important implications for morbidity and mortality. Its incidence is steadily increasing throughout the world, but interventions and early diagnosis techniques have increased the frequency of diagnosis at an early stage. Early diagnosis, unfortunately, does not always guarantee the favorable progression of the disease. There are patients in whom the primary tumors are thin melanomas for which the surgical treatment and excision of the primary lesion are sufficient to ensure cure of the disease. From the same category of patients with thin melanomas, in some the disease progresses, causing metastases, even after a long period of time from excision. There are also patients who see a doctor late, when the tumor thickness has increased significantly and the disease has already metastasized. These patients require, besides surgical treatment, other systemic treatments in an attempt to control the disease and prolong survival. Significant progress has been made in the past few years both in the sphere of melanoma pathogenesis and in systemic treatment for advanced disease cases, which have led to significant increase in survival of the affected patients. Despite these findings, after a relatively stable period, the disease progresses again.

These aspects indicate the need to identify new markers that are easy to determine by minimally invasive techniques, and to predict disease progression or response to treatment faster and better than currently available imaging methods.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Histopathological features that have a prognostic role in melanoma have been studied for over half a century. Those that have been shown to have a role in disease progression in patients with melanoma are: tumor thickness (Breslow index), Clark invasion level, tumor growth (radial versus vertical), ulceration, mitotic rate, infiltrate inflammatory

lymphocyte, presence of regression, vascular or lymphatic invasion and the presence of microsatellite metastases. Another important factor for the prognosis of patients with melanoma is the presence of regional lymph node metastases.

Numerous studies have looked at various **immunohistochemical markers** in an attempt to detect certain proteins that predict the progression of melanoma patients, but most studies have been performed on a relatively small number of patients, and most of the studied markers do not have applicability in clinical practice.

The **molecular tumor markers** studied were genomic markers (mutations in BRAF, NRAS, KIT, etc.) and epigenomic markers (DNA methylation and microARNs).

Serum markers can be proteins (LDH, S100, MIA, cytokine, vitamin D, etc.) or molecular markers (circulating tumor cells, exosomes, circulating circulating acids, mirco-RNAs).

Some of the serum markers used for the prognosis and staging of patients with melanoma have also been shown to be efficacious as **predictors of response to treatment**. Systemic treatment in melanoma has been revolutionized in recent years by more detailed understanding of pathogenetic mechanisms involved in tumor appearance, which has led to the identification of new therapies, namely immunotherapy and targeted molecular therapy.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study I has 2 parts. In the first part, serum markers were analyzed: vitamin D, interleukin-6, interleukin-8 and interleukin-10 in patients with melanoma, and in the second part clinico-pathological features were analyzed in relation to disease progression and metastasis, in patients with melanoma. The first batch included 41 patients with histopathologically confirmed cutaneous melanoma in whom serum levels of vitamin D and IL-6, IL-8 and IL-10 were determined prior to primary tumor excision. For the

serum values obtained, their correlation with the stage or progression of the disease was attempted, but no positive correlation was obtained. The second batch included 173 patients with cutaneous melanoma in whom the clinical diagnosis of melanoma was confirmed by histopathological examination after the excision biopsy. In multivariate analysis, only the positive sentinel lymph node and the Breslow index greater than 2 mm were independent variables associated with disease recurrence.

Study II analyzed the role of histological regression and other clinical and histopathological characteristics for the prognosis and survival of melanoma patients. It included 173 patients with histopathologically confirmed melanoma in whom sentinel lymph node biopsy was performed. Only the minimal tumor infiltrating lymphocytes, the positive sentinel lymph node and the Breslow index greater than 2 mm had independent value for mortality prediction. Regression has not been associated with overall survival.

Study III aimed to evaluate vitamin D receptor polymorphisms in patients with melanoma and to analyze the correlation between these polymorphisms and the progression of melanoma. 96 patients with histopathologically confirmed cutaneous melanoma diagnosis, who were under the supervision of the Clinic of Dermatology Cluj, were included in the study. Based on the information available in the literature and based on their significance in other studies, we selected four polymorphisms for analysis: one that has been studied more - rs731236 (TaqI) and three less studied: rs2239182, rs4760674 and rs7305032. In the present study, no correlation could be noted between the vitamin D receptor polymorphisms studied (rs731236 or TaqI, rs2239182, rs4760674, rs7305032) and other clinico-pathological features with a known role in the prognosis of cutaneous melanoma patients.

General Conclusions

The study of the clinico-pathological characteristics in relation to disease progression and metastasis identified nodular histological type of melanoma, presence of ulceration, tumor thickness greater than 2 mm, minimal lymphatic infiltrate infiltration and sentinel lymph node positivity as prognostic factors for disease progression. The serum markers analyzed (vitamin D, IL-6, IL-8, IL-10)

could not be correlated with the identified histopathological prognostic factors nor with disease progression.

The presence of histological regression in patients with melanoma was identified as a favorable factor, being associated with the negative sentinel lymph node, but regression could not be correlated with disease progression. Histopathological features significantly associated with overall survival were: tumor thickness greater than 2 mm, nodular type of melanoma, minimal tumor infiltrating lymphocytes and positive sentinel lymph node.

The study of epigenetic markers - the vitamin D receptor polymorphisms - could not reveal a correlation between the genotype of melanoma patients for these polymorphisms and the tumor stage or progression of the disease and the occurrence of metastases, requiring studies on larger batches in which the genotype of patients is corroborated with phenotypic variations of vitamin D in peripheral blood.

Originality and innovative contributions of the thesis

The study about the clinico-pathological features has highlighted the role of tumor infiltrating lymphocytes in the progression of melanoma, which has been described by relatively few studies to date.

The evaluation of histological regression in melanoma was the first such study in Romania to identify the more favorable role of histological regression in patients with melanoma. It contributed to literature data, supporting the role of increased tumor thickness and positive sentinel lymph node as the main prognostic factors in melanoma.

The study of gene polymorphisms is innovative by studying some polymorphisms that have not been investigated so far. Although it has not been possible to demonstrate significant correlations statistically, this study will be continued on a larger number of patients in an attempt to correlate genotypic changes with phenotypic variations of vitamin D in order to understand the mechanism underlying the association between vitamin D and melanoma.