
TEZĂ DE DOCTORAT (REZUMAT)

Valoarea prognostică a răspunsului imun la pacienții cu melanom malign

Doctorand **Vlad Alexandru Gâta**

Conducător de doctorat Prof. Dr. **Patriciu Achimaș-Cadariu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	11
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Factori de prognostic clinici	
1.1. Vârsta	17
1.2. Sexul	18
1.3. Localizarea tumorii	19
2. Factori de prognostic morfopatologici	
2.1. Stadiul tumoral TNM	20
2.2. Rata mitotică	22
2.3. Statusul limfoganglionar	22
2.4. Marginile de rezecție	24
2.5. Ulcerația	25
2.6. Regresia tumorală	26
3. Factori de prognostic biologici și moleculari	
3.1. Instabilitatea microsateliților (MSI)	27
3.2. Mutațiile RAS	28
3.3. Mutațiile BRAF	29
4. Răspunsul imun în melanomul malign	30
4.1. Supravegherea imună	32
4.2. Mijloace de evadare imunologică	34
4.3. Imunoterapia	39
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	45
2. Metodologie generală	57
3. Studiul 1 - Valoarea limfocitelor infiltrativ tumorale ca și factor de prognostic privind statusul ganglionar și supraviețuirea în rândul pacienților cu melanom malign (studiu retrospectiv)	49
3.1. Introducere	49

3.2. Ipoteza de lucru/obiective	50
3.3. Material și metodă	50
3.4. Rezultate	52
3.5. Discuții	57
3.6. Concluzii	60
4. Studiul 2 - Valoarea expresiei factorului de transcripție FOXP3 al limfocitelor T reglatoare ca și factor de prognostic în rândul pacienților cu melanom malign în stadiul II și III (Studiu retrospectiv)	63
4.1. Introducere	63
4.2. Material și metodă	64
4.3. Rezultate	66
4.4. Discuții	74
4.5. Concluzii	78
5. Studiul 3 - Corelarea statusului mutațional al oncogenei BRAF cu densitatea limfocitelor infiltrativ tumorale (TILs) și cu principalii factori de prognostic histopatologici la pacienții cu melanom malign	79
5.1. Introducere	79
5.2. Material și metodă	81
5.3. Rezultate	82
5.4. Discuții	92
5.5. Concluzii	95
7. Concluzii generale (sinteză)	97
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	99
REFERINȚE	101

Cuvinte cheie: melanom malign, răspuns imun, limfocite infiltrativ tumorale, oncogene

INTRODUCERE

Melanomul malign (MM) reprezintă o tumoră malignă cu localizare la nivelul tegumentului sau al mucoaselor, care se produce prin proliferarea necontrolată a melanocitelor. Această patologie este cea mai agresivă și mai letală formă de cancer de piele. În ciuda faptului ca reprezintă mai puțin de 5% din totalul cancerelor cutanate, MM este responsabil de peste 60% dintre decesele cauzate de cancerul de piele. Dacă inițial era considerat un tip rar de cancer, în ultimii 50 ani, incidența a crescut alarmant, mai repede decât aproape a oricărui alt tip de cancer, atât în rândul persoanelor de sex feminin, cât și masculin și este într-o continuă pantă ascendentă.

Procesul fiziopatologic de melanomogeneză nu este încă pe deplin cunoscut. Cursul clinic al melanomului depinde de controlul creșterii ("growth control") care poate fi cercetat la nivel celular, oferind perspective diverse cu privire la o serie de oncogene și căi de semnalizare care sunt implicate în fiziopatologia melanomului. Melanomogeneză poate fi astfel identificată prin mutații la nivelul căilor de semnalizare, critice pentru supraviețuirea celulelor. Cea mai notabilă, calea protein kinazei mitogen activată (MAPK = lanț de proteine celulare care transmite un semnal de la un receptor de la suprafața celulei, la nivelul ADN-ului celular din nucleu), reglează creșterea, proliferarea, diferențierea și apoptoza celulară. Mutațiile de-a lungul acestei căi au ca rezultat o supraamplificare a semnalizării, ceea ce duce la dereglarea ciclului celular și o creștere celulară necontrolată. Calea PI3K/AKT reglează creșterea și proliferarea celulelor, PI3k-urile putând fi activate în mod similar prin leagarea receptorului tirozin kinazei sau direct stimulat de Ras. Ulterior PI3K fosforilează substratul său PIP2 pe membrana celulară în PIP3, contribuind la recrutarea și activarea AKT, care promovează creșterea și supraviețuirea celulelor, prin intermediul mai multor efectori, cum ar fi mTOR, Bad și Mdm2. De asemenea, cele mai frecvent întâlnite oncogene sunt reprezentate de BRAF, NRAS și c-kit. Totodată, cercetările biologice, moleculare, genetice și imunologice au deschis noi orizonturi, melanomul malign fiind considerat o tumoră înalt imunogenică, responsabilă la manipularea imunologică, astfel ca valoarea prognostică a răspunsului imun este intens cercetată în ultimii ani, atenția fiind îndreptată înspre proprietățile biologice ale celulelor tumorale și răspunsul imun al acestora în micromediul tumoral.

Prezenta cercetare doctorală, debutată în anul 2015, își propune să se alăture demersului internațional de a identifica noi factori de prognostic, biomarkeri, care să poată fi utilizați pentru exploatarea răspunsului imun al gazdei, având ca scop îmbunătățirea supraviețuirii pacienților.

Stadiul actual al cunoașterii

Formularea unui prognostic cât mai precis pentru pacienții cu melanom malign este vitală în vederea selectării unui regim terapeutic adecvat. Medicina personalizată s-a dezvoltat enorm în ultimii ani, permițând stratificarea pacienților în funcție de factorii de prognostic și instituirea unor protocoale terapeutice menite să crească supraviețuirea pacienților. În ceea ce privește factorii de prognostic clinici, cercetările nu au pus în evidență influențe semnificative ale prognosticului, rezultatele fiind în continuare controversate, spre deosebire de factorii de prognostic morfolopatologici, care rămân cei mai importanți, influențând rezultatele. Dintre aceștia, gradul de invazie tumorală, denumit ca și indice Breslow, scala Clark, rata mitotică, prezența ulcerăției și a regresiei, invazia perineurală și angiolimfatică, statusul limfoganglionar, prezența limfocitelor infiltrativ tumorale au fost studiați intens și reprezintă în continuare cele mai utilizate variabile în ceea ce privește formularea precisă a prognosticului. Totuși, în ciuda progreselor clinice și histologice, melanomul rămâne în continuare o patologie imprezibilă, cu potențial de metastazare ridicat în orice stadiu tumoral, astfel că eforturile recente și cercetările moleculare s-au îndreptat și spre elaborarea unor biomarkeri, respectiv molecule metabolic stabile, detectabile sau cuantificabile din sânge sau alte compartimente și care să fie accesibili prin proceduri minim invazive.

Melanomul malign reprezintă una dintre cele mai imunogenice tumori, datorită încărcăturii mutaționale genomice incredibil de mari, având cel mai mare potențial de a provoca răspunsuri imune specifice, cu efect adaptativ antitumoral. Astfel, s-a observat că plasticitatea celulelor melanomului duce la apariția unui fenomen numit "evadare imună", prin care celulele canceroase dobândesc atât un fenotip mai puțin imunogen cât și abilitatea de a suprima efectele antitumorale ale celulelor imune. Mai mult decât atât, prin descoperirea și elucidarea mecanismelor de progresie tumorală, s-a reușit parțial realizarea unei strategii terapeutice de contracarare a evadării imunologice. În acest sens, rolul prognostic al răspunsului imun a atras atenția multor cercetători în ultimii ani, care au studiat proprietățile biologice și imunologice ale celulelor tumorale la nivelul micromediului tumoral, cu scopul de a elabora biomarkeri cu rol predictiv în ceea ce privește atât prognosticul cât și răspunsul la tratamentele oncologice. Astfel, limfocitelor infiltrativ tumorale (TILs), care reprezintă o reflexie histopatologică locală a răspunsului imun al gazdei împotriva celulelor tumorale, li s-a acordat o atenție sporită, fiind un domeniu de cercetare intens exploatat, studii multiple concluzionând că prezența lor este asociată cu un prognostic favorabil. Fiind un grup celular heterogen, TILs sunt reprezentate nu doar din celule efectoare, ci și exhaustive, reglatoare (Treg), supresoare, dendritice, natural killer (NK), macrofage, precum și alte celule imune. La nivel tumoral, există un amestec de celule CD4+ și CD8+, ale căror proporții la nivelul țesuturilor tumorale sunt diferite; dintre acestea,

CD8+ TILs reprezintă principalele celule efectoare antitumorale, iar prezența lor a fost incriminată ca și factor de prognostic favorabil în diferite cancere. CD4+ TILs exercită funcții diferite, jucând un rol important în ceea ce privește activarea limfocitelor T citotoxice și menținerea funcțională a memoriei limfocitelor T CD8+, fiind astfel responsabile și de imunitatea antitumorală, spre deosebire de CD4+ T reglatoare (Tregs) care exercită un efect de inhibiție al răspunsului imun antitumoral, inducând imunosupresia. Exploatănd astfel valoarea răspunsului imun, noi agenți terapeutici au fost descoperiți, imunoterapia îmbunătățind prognosticul pacienților, în special al celor cu metastaze locoregionale sau la distanță.

Contribuția personală

Studiul 1 - Valoarea limfocitelor infiltrativ tumorale ca și factor de prognostic privind statusul limfoganglionar și supraviețuirea în rândul pacienților cu melanom malign

Scop: Evaluarea principalilor factori de prognostic clinici și morfopatologici implicați în diagnosticul melanomului malign, precum și investigarea valorii prognostice a limfocitelor infiltrativ tumorale asupra ratelor de metastaze ganglionare și asupra supraviețuirii globale.

Materiale și metode: Din 1842 pacienți cu melanom malign confirmat, spitalizați în Institutul Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Cluj - Napoca (IOCN), în perioada Ianuarie 2000 - decembrie 2015, în urma aplicării criteriilor de includere și excludere, am selectat un număr de 114 pacienți, doar cu stadiul tumoral pT3, care au fost incluși în prezentul studiu. Factorii de prognostic clinici incluși în studiu și analizați au fost sexul și vârsta la momentul diagnosticului. Dintre factorii de prognostic histopatologici, am analizat: subtipul histologic, indicele Breslow, scala Clark, rata mitotică (per mm²), prezența sau absența ulcerăției, densitatea infiltratului limfocitar peritumoral (TILs), statusul limfoganglionar, prezența sau absența regresiei, microsatelitoza. Densitatea infiltratului limfocitar peritumoral a fost definită conform studiilor din literatură, respectiv conform următoarei scheme: absent, non-brisk și brisk.

Rezultate: Un infiltrat limfocitar de tip brisk a fost identificat în 60% din cazuri, în timp ce la 40% dintre pacienți infiltratul a fost slab sau absent. În urma analizei univariate, am putut observa că pacienții cu infiltrat limfocitar peritumoral de tip non-brisk sau absent, au o tendință mai ridicată de a se prezenta cu ulcerăție (pT3b)

($p=0.021$). De asemenea, ca urmare a analizei multivariate, am putut observa că prezența microsatelitozei ($p=0.011$), a invaziei ganglionare ($p=0.031$) și a limfocitelor infiltrativ tumorale de tip non-brisk ($p=0.04$) au fost corelați cu o rată mai ridicată de deces. Totodată, analizând curbele de supraviețuire Kaplan - Meier, pacienții cu infiltrat limfocitar non-brisk ($p=0.03$) și cu invazie ganglionară ($p=0.005$) au avut rate de supraviețuire semnificativ mai scăzute.

Concluzie: Prezența limfocitelor infiltrativ tumorale cu o dispoziție densă la nivel tumoral a fost corelată cu o rată semnificativ mai mică de metastaze ganglionare și cu o supraviețuire net superioară, putând considera că gradul de infiltrare limfocitară reprezintă un predictor independent în ceea ce privește prognosticul pacienților cu melanom malign.

Studiul 2 - Valoarea expresiei factorului de transcripție FOXP3 al limfocitelor T reglatoare ca și factor de prognostic în rândul pacienților cu melanom malign în stadiul II și III

Scop: Am analizat un lot de pacienți cu melanom malign în stadiul pT3 iar obiectivul principal a fost de a evalua dacă o supraexpresie a Treg FoxP3 este corelată cu progresia tumorală și cu o supraviețuire globală modestă. De asemenea, obiectivele secundare au fost de a evalua potențiale corelații între expresia FoxP3 și alți factori de prognostic clinicopatologici implicați în melanomul malign.

Materiale și metode: Au fost incluși un număr de 79 pacienți spitalizați în Institutul Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Cluj - Napoca (IOCN), în perioada Ianuarie 2000 - decembrie 2015. Lamele celor 79 pacienți, aflate în arhiva Institutului Oncologic "Prof. Dr. I. Chiricuță", au fost reevaluate de către un medic anatomopatolog, selectând zona de interes, care a fost ulterior identificată pe blocul de parafină corespunzător. Fragmentele tumorale au fost incluse și reasezate într-un număr mai mic de blocuri de parafină, denumite TMA (Tissue Microarray), metodă economică ce a permis analiza a multiple probe biologice. Astfel, au fost prelevate probe de țesut de aproximativ 2 mm, din care au fost realizate 3 blocuri TMA. Secțiunile au fost colorate în dublu marcaj, cu 2 anticorpi: un anticorp primar FOXP3, precum și un anticorp secundar de colorare. Analiza expresiei Treg FoxP3 a fost realizată printr-o evaluare cantitativă, generând un scor automat al imunohistochimiei: pozitiv sau negativ.

Rezultate: Expresia limfocitelor T reglatoare și a factorului de transcripție FOXP3 a fost pozitivă într-o proporție de 81.01% cazuri, în timp ce la 18,99% din pacienți, expresia a fost negativă. În urma analizei univariate, o expresie pozitivă a Treg FOXP3 a fost corelată cu o rată mai ridicată de recidive tumorale ($p=0.007$) și deces ($p=0.004$), precum și cu o rată mai mare de metastaze ganglionare ($p=0.03$). Analiza multivariată a evidențiat un risc semnificativ mai mare de deces la pacienții cu expresie pozitivă a Treg FOXP3 ($p=0.005$) și la cei cu metastaze ganglionare ($p=0.003$).

Concluzii: Expresia pozitivă a Treg FoxP3 are un impact semnificativ asupra prognosticului pacienților cu melanom malign și poate fi utilizat ca și biomarker pentru melanoamele cutanate primare. Mai mult, colorația imunohistochimică FoxP3 este facil de realizat în laborator și poate fi utilizată pentru a identifica și stratifica mult mai ușor managementul pacienților cu risc ridicat de a dezvolta metastaze ganglionare, precum și pentru cei cu un risc crescut de progresie tumorală și recurență.

Studiul 3 - Corelarea statusului mutațional al oncogenei BRAF cu densitatea limfocitelor infiltrativ tumorale (TILs) și cu principalii factori de prognostic histopatologici la pacienții cu melanom malign

Scop: Obiectivul primar a fost evaluarea unei potențiale corelații între statusul mutațional al oncogenei BRAF și densitatea limfocitelor infiltrativ tumorale. În plus, obiectivele secundare propuse includ validarea unor asocieri între mutația BRAF și principalele caracteristici histopatologice ale melanomului malign, pentru pacienții cu stadiu tumoral pT3, cu scopul de a confirma statusul mutațional al BRAF ca și biomarker (aparte de valoarea prognostică pentru prezicerea răspunsului la tratamentul cu inhibitori BRAF) pentru formularea unui prognostic în rândul pacienților cu melanom malign.

Materiale și metode: După consultarea bazelor de date ale Institutului Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuța" Cluj - Napoca, pe o perioadă de 6 ani, din ianuarie 2015 până în noiembrie 2020, cohorta de studiu a fost formată din 49 de pacienți. Parametrii clinici și morfopatologici au fost identificați prin analiza dosarelor clinice și a rapoartelor histopatologice ale pacienților. Blocurile de țesut cu tumorile primare, încorporate în parafină, au fost preluate de la Departamentul de Anatomie Patologică, iar analiza mutației oncogenei BRAF a fost efectuată pe probe tumorale primare, la fiecare dintre pacienții incluși, fiind un criteriu de includere în studiu.

Rezultate: Din totalul de 49 de pacienți, un număr de 32 (64.31%) au prezentat un status mutațional pozitiv al oncogenei BRAF, cel mai frecvent tip identificat fiind reprezentat V600E, în peste 90% din cazuri. Analiza univariată a evidențiat o corelație între statusul mutațional al BRAF și limfocitele infiltrativ tumorale, un pacient BRAF pozitiv având un risc semnificativ mai mare ca infiltratul limfocitar peritumoral să fie de tip non-brisk, asociindu-se astfel cu o imunosupresie locală, ceea ce ar putea favoriza o proliferare mai accentuată și un stadiu tumoral mai avansat ($p < 0.001$). S-a realizat și analiza multivariată de prezicere a metastazelor ganglionare în funcție de diverși factori de prognostic, observându-se că la pacienții cu un infiltrat limfocitar de tip non-brisk, există un risc de 12.5 ori mai mare de a dezvolta metastaze la nivel ganglionar. S-a analizat de asemenea și evoluția intervalului liber de boală în funcție de diferiți parametri histopatologici, prezența metastazelor ganglionare ($p = 0.011$) și a ulcerăției ($p = 0.016$) reflectându-se în mod negativ asupra supraviețuirii pacienților.

Concluzii: Am putut observa că există o corelație între statusul mutațional al oncogenei BRAF și densitățile limfocitelor infiltrativ tumorale, melanoamele BRAF pozitive prezentând cu preponderență un infiltrat limfocitar peritumoral de tip non-brisk. Acest lucru poate indica faptul că o mutație BRAF pozitivă poate împiedica generarea unui răspuns imun la nivel tumorii primare, ceea ce conduce la o imunosupresie a micromediului tumoral și un comportament local mai agresiv, facilitând progresia tumorală.

Concluzii generale, originalitate și contribuții inovative

1. Parametrii histopatologici reprezintă cei mai importanți factori de prognostic în melanomul malign, astfel că o expertiză histopatologică riguroasă este esențială / primordială.
2. Stadiul tumoral pT3 poate fi considerat un stadiu borderline în ceea ce privește modul de abordare al stadializării ganglionare și al tratamentului adjuvant, incluzând o grosime tumorală semnificativă, de peste 2 mm, melanoamele în acest stadiu având un comportament absolut imprevizibil.
3. Tratamentul melanomelor avansate locoregional reprezintă în continuare o provocare, cu rate ridicate de progresie și recidivă tumorală, motiv pentru care sunt necesari biomarkeri cu scopul de a formula un diagnostic cât mai precis, precum și de a evalua răspunsul la tratament, în special la imunoterapie.
4. Limfocitele infiltrativ tumorale reprezintă un factor de prognostic independent în ceea ce privește rata de metastazare ganglionară și supraviețuirea globală.

5. Expresia intens pozitivă a factorului de transcripție al limfocitelor T reglatoare (Treg FoxP3) este asociată cu un risc ridicat de recidivă tumorală și deces, comparativ cu expresia negativă a Treg FoxP3.
6. Un status mutațional pozitiv al oncogenei BRAF se corelează cu un infiltrat limfocitar peritumoral de tip non-brisk sau absent, dar nu influențează rata de metastazare ganglionară, riscul de recidivă sau supraviețuirea globală la pacienții cu melanom malign stadiul pT3.

Valoarea prognostică a răspunsului imun este de mare interes actual, existând o multitudine de studii cu rezultate controversate, nefiind stratificate în funcție de stadiul tumoral. În acest sens, studiul nostru include o cohortă de pacienți într-un stadiu în care melanomul este imprezvizibil, iar managementul este dificil prin prisma ratelor ridicate de metastazare și recurență, astfel că rezultatele noastre oferă informații noi ce vor putea fi utilizate în viitor pentru elucidarea și înțelegerea mecanismelor de acțiune ale limfocitelor T reglatoare, precum și pentru elaborarea unor anticorpi monoclonali care să contracareze mijloacele de evadare imună ale melanomului. În plus, determinarea expresiei Treg FoxP3 reprezintă o colorație imunohistochimică abordabilă tehnic și cu costuri reduse, care ar putea ajuta la identificarea pacienților cu risc ridicat de a dezvolta metastaze ganglionare sau recidivă tumorală, precum și de a cuantifica riscul de deces, utilizarea lor ca mecanism de reactivare a imunității antitumorale având ca scop scăderea morbidității și mortalității legate de această patologie.

În final, considerăm că factorii de prognostic studiați și validați în cadrul acestei teze reprezintă o parte importantă de evaluat înaintea instituirii unui tratament oncologic și ar trebui avuți în vedere în elaborarea unor scoruri de histoprognostic în funcție de limfocite. Practic, aplicarea conceptului de medicină personalizată trebuie să includă și imunitatea înăscută antitumorală, care, prin exploatarea răspunsului imun și prin utilizarea terapiilor moderne, trebuie să îmbunătățească supraviețuirea generală a pacienților cu melanom malign.

PhD THESIS SUMMARY

THE PROGNOSTIC VALUE OF THE IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH MALIGNANT MELANOMA

PhD Student **Vlad Alexandru Gâta**

PhD Supervisor Prof. Dr. **Patriciu Achimaș-Cadariu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	11
THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Clinical prognostic factors	
1.1. Age	17
1.2. Gender	18
1.3. Tumor primary site	19
2. Morphopathological prognostic factors	
2.1. TNM stage	20
2.2. Mitotic rate	22
2.3. Lymph node status	22
2.4. Resection margins	24
2.5. Ulceration	25
2.6. Tumor regression	26
3. Biological and molecular prognostic factors	
3.1. Instabilitatea microsateliților (MSI)	27
3.2. Mutațiile RAS	28
3.3. Mutațiile BRAF	29
4. The immune response in malignant melanoma	30
4.1. Immune surveillance	32
4.2. Means of immune escape	34
4.3. Immunotherapy	39
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Objectives	45
2. General methodology	57
3. Study 1 - The value of tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic factor for lymph node status and survival among patients with malignant melanoma	49
3.1. Introduction	49
3.2. Objective	50
3.3. Material and method	50

3.4. Results	52
3.5. Discussion	57
3.6. Conclusions	60
4. Study 2 - The expression of FOXP3 transcription factor of regulatory T lymphocytes as a prognostic factor among patients with stage II and III malignant melanoma	63
4.1. Introduction	63
4.2. Material and method	64
4.3. Results	66
4.4. Discussion	74
4.5. Conclusions	78
5. Studiul 3 - The correlation of the mutational status of BRAF oncogene with tumor infiltrating lymphocyte density (TILs) and major histopathological prognostic factors in patients with malignant melanoma	79
5.1. Introduction	79
5.2. Material and method	81
5.3. Results	82
5.4. Discussion	92
5.5. Conclusions	95
7. General conclusion (synthesis)	97
8. Originality and innovative contributions	99
REFERENCES	101

Keywords: malignant melanoma, immune response, tumor infiltrating lymphocytes, oncogenes

INTRODUCTION

Cutaneous melanoma represent a malignant tumor with skin and mucosal involvement, which occurs through the uncontrolled proliferation of melanocytes. This pathology is the most aggressive and lethal form of skin cancer. Despite accounting for less than 5% of all skin cancers, MM is responsible for over 60% of skin cancer related deaths. Initially it was considered as a rare type of malignancy, however, the incidence has increased alarmingly in the past 50 years, faster than any other type of cancer, both among females and males, following an ascending pathway.

The pathophysiological process of melanomogenesis is not yet fully known. The clinical course of melanoma depends on the growth control that can be researched at the cellular level, offering various perspectives on a number of oncogenes and signaling pathways that are involved in the pathophysiology of melanoma. Melanomogenesis can thus be identified by mutations in the signaling pathways, critical for cell survival. Most notably, the mitogen-activated protein kinase pathway (MAPK = cellular protein chain that transmits a signal from a receptor on the cell surface to the cellular DNA in the nucleus) regulates cell growth, proliferation, differentiation, and apoptosis. Mutations along this pathway result in signal amplification, leading to cell cycle disorder and uncontrolled cell growth. The PI3K / AKT pathway regulates cellular growth and proliferation, as PI3k can be similarly activated by binding to the tyrosine kinase receptor or directly stimulated by Ras. PI3K subsequently phosphorylates its PIP2 substrate on the cell membrane into PIP3, contributing to the recruitment and activation of AKT, which promotes cell growth and survival, through several effectors, such as mTOR, Bad and Mdm2. Also, the most common oncogenes are BRAF, NRAS and c-kit. At the same time, biological, molecular, genetic and immunological research has opened new horizons, malignant melanoma being considered a highly immunogenic tumor, responsive to immunological manipulation; therefore the prognostic value of the immune response is being intensively researched in recent years, focusing on biological properties of tumor cells, as well as their immune response in the tumor microenvironment.

This research, started in 2015, aims to join the international effort in order to identify new prognostic factors, biomarkers, that can be used to exploit the host's immune response, focusing on improving patient's survival.

The current state of knowledge

Formulation of a more accurate prognosis for patients with malignant melanoma is vital in order to select an appropriate therapeutic regimen. Personalized

medicine has developed enormously in recent years, allowing the stratification of patients according to prognostic factors, as well as the establishment of therapeutic protocols designed to increase patient survival. Regarding the clinical prognostic factors, the research did not show significant influences of the prognosis, the results being still controversial, unlike the morphopathological prognostic factors, which remain the most important. Of these, the degree of tumor invasion, referred to as the Breslow index, Clark scale, mitotic rate, presence of ulceration and regression, perineural and angiolymphatic invasion, lymph node status, the presence of infiltrative tumor lymphocytes were intensively used and represent the most widely studied. However, despite clinical and histological advances, malignant melanoma remains an unpredictable pathology, with high potential for metastasis in any tumor stage, so that recent efforts and molecular research have focused on the development of biomarkers, respectively metabolically stable molecules, detectable or quantifiable from blood or other compartments and accessible by minimally invasive procedures.

Malignant melanoma is considered one of the most immunogenic tumors, due to the incredibly high genomic mutational load, having the greatest potential to provoke specific immune responses, with adaptive antitumor effects. Thus, it has been observed that the plasticity of melanoma cells leads to a phenomenon called "immune escape", through which cancer cells acquire both a less immunogenic phenotype and also the ability to suppress the antitumor effects of immune cells. Moreover, by discovering and elucidating the mechanisms of tumor progression, it was possible to partially achieve a therapeutic strategy to counteract the immune escape. In this regard, the prognostic role of the immune response has attracted the attention of many researchers in recent years, who have studied the biological and immunological properties of tumor cells in the tumor microenvironment, in order to develop biomarkers with predictive role in both the prognosis and response to oncological treatments. Therefore, tumor infiltrative lymphocytes (TILs), which represent a local histopathological reflection of the host immune response against tumor cells, have been given increased attention, being an intensively exploited field of research, multiple studies concluding that their presence is associated with a better prognosis. Being a heterogeneous cell group, TILs are represented not only by effector cells, but also exhaustive, regulatory (Treg), suppressor, dendritic, natural killer (NK), macrophages, and other immune cells. At the tumor level, there is a mixture of CD4 + and CD8 + cells, whose proportions in tumor tissues are different; of these, CD8 + TILs are the main antitumor effector cells, and their presence has been implicated as a favorable prognostic factor in various cancers. CD4 + TILs perform different functions, playing an important role in the activation of cytotoxic T lymphocytes and maintaining the functional memory of CD8 + T lymphocytes, thus being responsible for antitumor immunity, as opposed to regulatory CD4 + T (Tregs) which exert an inhibitory effect of the antitumor immune response, inducing immunosuppression. Exploiting the value of the immune response, new therapeutic agents have been discovered, immunotherapy

improving the prognosis of patients, especially those with locoregional or distant metastases.

Personal contribution

Study 1 - The value of tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic factor for lymph node status and survival among patients with malignant melanoma

Purpose: To evaluate the main clinical and morphopathological prognostic factors involved in the diagnosis of malignant melanoma, as well as to investigate the prognostic value of infiltrative tumor lymphocytes on the rates of lymph node metastases and on overall survival.

Materials and methods: Out of 1842 patients with confirmed malignant melanoma, hospitalized in the Oncological Institute "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Cluj - Napoca (IOCN), between January 2000 - December 2015, following the application of inclusion and exclusion criteria, we selected a total of 114 patients, with pT3 tumor stage, who were included in the present study. The clinical prognostic factors included and analyzed in the study were sex and age at the time of diagnosis. Among the histopathological prognostic factors, we analyzed: histological subtype, Breslow index, Clark scale, mitotic rate (per mm²), presence or absence of ulceration, density of peritumoral lymphocytic infiltrate (TILs), lymph node status, presence or absence of regression. The density of peritumoral lymphocyte infiltrate was defined according to the current guidelines in the literature: absent, non-brisk and brisk.

Results: A brisk lymphocyte infiltrate was identified in 60% of cases, while in 40% of patients the infiltrate was non-brisk or absent. Following the univariate analysis, we could observe that patients with non-brisk or absent peritumoral lymphocytic infiltrate had a higher tendency to present with ulceration (pT3b) ($p = 0.021$). Also, following the multivariate analysis, we observed that the presence of microsatellitosis ($p = 0.011$), lymph node invasion ($p = 0.031$) and a non-brisk lymphocytic infiltrate ($p = 0.04$) were correlated with a higher risk of death. At the same time, analyzing the Kaplan - Meier survival curves, patients with non-brisk lymphocytic infiltrate ($p = 0.03$) and with lymph node invasion ($p = 0.005$) had significantly lower survival rates.

Conclusion: The presence of a brisk tumor infiltrating lymphocytes was correlated with a significantly lower rate of lymph node metastases and a clearly higher survival,

considering that the degree of lymphocyte infiltration is an independent predictor in the prognosis of patients with malignant melanoma.

Study 2 - The expression of FOXP3 transcription factor of regulatory T lymphocytes as a prognostic factor among patients with stage II and III malignant melanoma

Purpose: We analyzed a group of patients with pT3 stage malignant melanoma and the main objective was to assess whether an overexpression of Treg FoxP3 is correlated with tumor progression and modest overall survival. Secondary endpoints were to evaluate potential correlations between FoxP3 expression and other clinicopathological prognostic factors involved in malignant melanoma.

Materials and methods: A number of 79 patients hospitalized in the Institute of Oncology "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Cluj - Napoca (IOCN) were included, between January 2000 and December 2015. The anatomopathological slides of the 79 patients were re-evaluated by a different anatomopathologist, selecting the area of interest, which was subsequently identified on the corresponding paraffin block. Tumor fragments were included and placed in a smaller number of paraffin blocks, called TMA (Tissue Microarray), an economical method that allowed the analysis of multiple biological samples. Thus, tissue samples of approximately 2 mm were taken, from which 3 TMA blocks were made. Sections were stained with 2 antibodies: a primary FOXP3 antibody, as well as a secondary staining antibody. Analysis of Treg FoxP3 expression was performed by a quantitative evaluation, generating an automatic score of immunohistochemistry: positive or negative.

Results: The expression of regulatory T lymphocytes and the transcription factor FOXP3 was positive in a proportion of 81.01% of cases, while in 18.99% of patients, the expression was negative. Following univariate analysis, a positive expression of Treg FOXP3 was correlated with a higher rate of tumor recurrence ($p = 0.007$) and death ($p = 0.004$), as well as a higher rate of lymph node metastases ($p = 0.03$). Multivariate analysis revealed a significantly higher risk of death in patients with positive expression of Treg FOXP3 ($p = 0.005$) and in those with lymph node metastases ($p = 0.003$).

Conclusions: The positive expression of Treg FoxP3 has a significant impact on the prognosis of patients with malignant melanoma and can be used as a biomarker for primary cutaneous melanomas. Moreover, FoxP3 immunohistochemical staining is

easy to perform in the laboratory and can be used to more easily identify and stratify the management of patients at high risk of developing lymph node metastases, as well as for those at increased risk of tumor progression and recurrence.

Study 3 - The correlation of the mutational status of BRAF oncogene with tumor infiltrating lymphocyte density (TILs) and major histopathological prognostic factors in patients with malignant melanoma

Purpose: The primary objective was to evaluate a potential correlation between the mutational status of the BRAF oncogene and the density of tumor infiltrating lymphocytes. In addition, secondary objectives included validating associations between BRAF mutation and the main histopathological features of malignant melanoma for patients with pT3 tumor stage, in order to confirm the mutational status of BRAF as a biomarker used to formulate a more precise prognosis among patients with malignant melanoma.

Materials and methods: After consulting the databases of the Institute of Oncology "Prof. Dr. Ion Chiricuța" Cluj - Napoca, for a period of 6 years, from January 2015 to November 2020, the study cohort consisted of 49 patients. Clinical and morphopathological parameters were identified by analyzing clinical records and histopathological reports of the patients. Tissue blocks with primary tumors, embedded in paraffin, were taken from the Department of Pathological Anatomy, and the analysis of the BRAF oncogene mutation was performed on primary tumor samples in each of the included patients, being a criterion for inclusion in the study.

Results: Out of a total of 49 patients, 32 (64.31%) had a positive mutational status of the BRAF oncogene, the most commonly identified type being V600E, in over 90% of cases. The univariate analysis revealed a correlation between the mutational status of BRAF and tumor infiltrating lymphocytes, a BRAF positive patient having a significantly higher risk of presenting with a non-brisk peritumoral lymphocytic infiltrate, thus being associated with local immunosuppression, which could favor a more accentuated proliferation and a more advanced tumor stage ($p < 0.001$). Multivariate analysis of predicting lymph node metastases was performed based on various prognostic factors, noting that in patients with a non-brisk lymphocytic infiltrate there is a 12.5 times higher risk of developing lymph node metastases. The

evolution of the disease-free interval according to different histopathological parameters was also analyzed, the presence of lymph node metastases ($p = 0.011$) and ulceration ($p = 0.016$) reflecting negatively on patients' survival.

Conclusions: We could observe that there is a strong correlation between the mutational status of the BRAF oncogene and the densities of tumor infiltrating lymphocytes, the BRAF positive melanomas predominantly presenting a non-brisk peritumoral lymphocytic infiltrate. This may indicate that a positive BRAF mutation may prevent the generation of an immune response in the primary tumor, leading to immunosuppression in the tumor microenvironment and more aggressive local behavior, facilitating tumor progression.

Conclusion, originality and innovative contributions

1. Histopathological parameters are the most important prognostic factors in malignant melanoma, so a rigorous histopathological expertise is essential / primordial.
2. pT3 tumor stage can be considered a borderline stage in terms of how to approach lymph node staging and adjuvant treatment, including a significant tumor thickness of more than 2 mm, melanomas at this stage having an absolutely unpredictable behavior.
3. The treatment of locally advanced melanomas continues to be a challenge, with high rates of tumor progression and recurrence, which is why biomarkers are needed in order to make a diagnosis as accurate as possible and to assess the response to treatment, especially in immunotherapy.
4. Tumor infiltrative lymphocytes are an independent prognostic factor in terms of lymph node metastasis rate and overall survival.
5. Intense positive expression of regulatory T lymphocyte transcription factor (Treg FoxP3) is associated with a high risk of tumor recurrence and death, compared with negative expression of Treg FoxP3.
6. A positive mutational status of the BRAF oncogene correlates with a non-brisk or absent peritumoral lymphocytic infiltrate, but does not influence the rate of lymph node metastasis, the risk of recurrence or overall survival in patients with pT3 malignant melanoma.

The prognostic value of the immune response is currently of great interest, however there are a multitude of studies with controversial results, studies that are not being stratified according to the tumor stage. In this regard, our study includes a

cohort of patients at a stage when melanoma is unpredictable and management is difficult due to high rates of metastasis and recurrence, so our results provide new information that can be used in the future to elucidate and understand the mechanisms of action of regulatory T lymphocytes, as well as for the development of monoclonal antibodies to counteract the means of immune escape of melanoma. In addition, the determination of Treg FoxP3 expression is a technically affordable and low-cost immunohistochemical staining that could help identify patients at high risk of developing lymph node metastases or tumor recurrence, as well as to quantify the risk of death.

Finally, we consider that the prognostic factors studied and validated in this thesis represent an important part to evaluate before instituting cancer treatments and should be considered in the development of histoprognostic scores based on lymphocytes. Basically, the application of the concept of personalized medicine must also include innate antitumor immunity, which, by exploiting the immune response and using modern therapies, must improve the overall survival of patients with malignant melanoma.