
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Studiu epidemiologic, clinic și investigativ al melanoamelor acrale și mucoase

Doctorand **Lavinia Elena Rostogol (Grigore)**

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



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE.....	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	17
1. Melanoame acrale și mucoase- epidemiologie, factori de risc și prezentare clinică.....	19
1.1. Epidemiologia melanomului.....	19
1.1.1. Epidemiologia melanoamelor acrale.....	19
1.1.2. Epidemiologia melanoamelor mucoase.....	20
1.2. Distribuția anatomică și topografică a melanoamelor acrale și mucoase.....	20
1.2.1. Factori de risc în dezvoltarea melanomului.....	21
1.3.1. Rolul mutațiilor germline în apariția melanomului.....	21
1.3.1.1. Rolul fenotipului nevilor în apariția melanomului.....	21
1.3.1.2. Rolul mutațiilor somatice în apariția melanomului.....	22
1.3.3. Rolul factorilor extrinseci în apariția melanomului.....	22
1.3.3.1. Radiațiile ultraviolete.....	22
1.3.3.2. Trauma și zonele de presiune.....	22
1.3.3.3. Expunerea la carcinogeni.....	23
1.3.3.4. Factori infecțioși.....	23
1.4. Spectrul clinic al melanoamelor acrale și mucoase.....	23
1.4.1. Spectrul clinic al melanoamelor acrale primare.....	23
1.4.2. Spectrul clinic al melanoamelor primare ale aparatului unghial.....	24
1.4.3. Spectrul clinic al melanoamelor mucoase primare.....	24
1.4.3.1. Melanoamele mucoase ale capului și gâtului.....	24
1.4.3.2. Melanoamele mucoase vulvovaginale.....	25
1.4.3.3. Melanoamele mucoase anorectale.....	25
1.5. Algoritmi de diagnostic clinic pentru melanoamele acrale și mucoase.....	25
1.5.1. Criteriile ABCDE pentru diagnosticul melanomului cutanat primar indiferent de localizare.....	25
1.5.1.1. Criterii clinice pentru diagnosticul melanoamelor acrale plantare.....	26
1.5.1.2. Criterii ABCDEF pentru diagnosticul melanoamelor subunghiale.....	26
1.5.1.3. Criterii ABCD adiționale pentru diagnosticul melanomului.....	27
1.5.1.4. Valoarea și eficacitatea criteriilor ABCDE.....	27
1.5.2. Metoda “ Ugly duckling”	28
1.5.3. Metoda celor 7 puncte Glasgow.....	28
1.5.4. Trainingul imagistic clinic- Rolul Rețelelor Neurale Convoluționale.....	28
2. Rolul metodelor imagistice noninvazive în evaluarea melanoamelor acrale și mucoase.....	29
2.1. Rolul dermatoscopiei în evaluarea leziunilor pigmentare.....	29
2.1.1. Rolul dermatoscopiei în diagnosticul melanoamelor palmo-plantare.....	30
2.1.1.1. Modele dermatoscopice asociate leziunilor melanocitare acrale benigne.....	30
2.1.1.2. Modele dermatoscopice asociate melanomului acral.....	31
2.1.1.3. Afecțiuni benigne la nivel acral ce mimează dermatoscopic malignitatea.....	32
2.1.1.4. Algoritmi de diagnostic dermatoscopic pentru melanoamele acrale.....	32
2.1.2. Rolul dermatoscopiei în diagnosticul melanoamelor aparatului unghial.....	33
2.1.2.1. Tehnica examinării dermatoscopice a aparatului unghial.....	33
2.1.2.2. Dermatoscopia marginii libere a lamei unghiale.....	33
2.1.2.3. Cauze de pigmentație unghială nonmelanocitară.....	34
2.1.2.4. Cauze de pigmentație unghială melanocitară datorate activării melanocitelor.....	34
2.1.2.5. Cauze de pigmentație unghială melanocitară datorate proliferării melanocitelor.....	35
2.1.3. Rolul dermatoscopiei în diagnosticul melanoamelor mucoase.....	36
2.1.3.1. Modele dermatoscopice asociate leziunilor melanocitare mucoase.....	36
2.1.3.2. Algoritmi de diagnostic în melanoamele mucoase.....	36
2.2. Ultrasonografia cutanată.....	37
2.2.1. Ultrasonografia melanoamelor cutanate primare.....	37

3. Histopatologia și biologia moleculară a melanoamelor acrale și mucoase.....	39
3.1. Principalele subtipuri histologice de melanom.....	39
3.2. Melanoame asociate epitelului.....	39
3.2.1. Modificări moleculare în melanoame asociate cu expunere cronică la soare.....	40
3.2.2. Modificări moleculare în melanoame asociate cu expunere intermitentă la soare.....	40
3.2.3. Modificări moleculare în melanoame ale pielii glabre.....	40
3.2.4. Modificări moleculare în melanoamele mucoase.....	40
3.3. Melanoame non asociate epitelului.....	41
3.4. Gene implicate în apariția melanoamelor acrale.....	41
3.4.1. KIT.....	41
3.4.2. CCND1.....	41
3.4.3. BRAF și NRAS.....	42
3.4.4. CDKN2A.....	42
3.4.5. TERT și AURKA.....	42
3.4.6. NUA2.....	43
3.5. Căi celulare cu rol în patogeniza melanomului.....	43
3.5.1. Calea MAPK.....	43
3.5.2. Calea PI3K/AKT/PTEN.....	43
3.5.3. Calea JAK/STAT3.....	43
3.5.4. Calea TERT.....	43
3.5.5. Calea CDK4/CDKN2A.....	43
3.5.6. Calea MDM2/TP53.....	44
3.5.7. Semnalizarea WNT.....	44
3.5.8. Calea MCR1-MITF.....	44
3.6. Concluzii.....	44
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....	45
1. Ipoteză de lucru. Obiective.....	47
2. Metodologie generală.....	49
3. Studiul 1. Studiu epidemiologic și clinicopatologic al melanoamelor acrale și mucoase versus melanoame cu alte localizări.....	51
3.1. Introducere.....	51
3.2. Obiective.....	51
3.3. Material și metodă.....	51
3.4. Rezultate.....	51
3.5. Discuții.....	51
3.6. Concluzii.....	51
4. Studiul 2. Frecvența structurilor dermatoscopice definitorii pentru melanoamele acrale și mucoase și corelarea acestora cu grosimea melanomului.....	63
4.1. Introducere.....	63
4.2. Obiective.....	63
4.3. Material și metodă.....	63
4.4. Rezultate.....	65
4.5. Discuții.....	80
4.6. Concluzii.....	83
5. Studiul 3. Corelații dermatoscopice, ultrasonografice și imunohistochimice în melanoamele acrale	85
5.1. Introducere.....	85
5.2. Obiective.....	85
5.3. Material și metodă.....	85
5.4. Rezultate.....	87
5.5. Discuții.....	96
5.6. Concluzii.....	98
6. Studiul 4. Modificări genetice în melanoamele acrale primare și nevii melanocitari acrali versus melanoamele primare și nevii melanocitari dezvoltate pe zone fotoexpuse–studiu comparativ pilot NGS Ion Torrent.....	99
6.1. Introducere.....	99
6.2. Obiective.....	99

6.3. Material și metodă.....	100
6.4. Rezultate.....	106
6.5. Discuții.....	117
6.6. Concluzii.....	119
7. Concluzii generale.....	121
8. Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei.....	123
9. Referințe.....	125

Cuvinte cheie: melanom acral, melanom mucos, dermatoscopie, ultrasonografie, imunohistochimie, NGS Ion Torrent, modificări genetice.

INTRODUCERE

Melanomul este unul din cancerele cutanate cu o incidență în continuă creștere, în special în țările vestice, unde s-au făcut eforturi susținute de educație a populației prin campanii de screening și prevenție. Melanomul nu este însă numai o tumoră a pielii, ci și o tumoră a mucoaselor. Formele de melanom cu localizări speciale, cum ar fi cele de la nivel acral: palmar, plantar sau aparat unghial și formele mucoase, sunt forme care nu au beneficiat de atenția campaniilor de educație, screening sau prevenție. Localizarea melanoamelor în aceste zone pune pacientul într-o postură uneori incomodă în timpul examenului clinic. Din acest motiv ele sunt neglijate multă vreme, prezentarea la medic se face în stadii tardive, iar prognosticul este nefavorabil.

Dermatoscopia, și mai nou videodermatoscopia digitală, sunt metode de diagnostic noninvazive ce permit stocare de imagini și comparare a acestora în timp. Se pot surprinde astfel modificări incipiente, în timp util pentru pacient. Ultrasonografia este de asemenea o metodă de diagnostic ce poate da detalii în timp real despre vascularizația tumorii și caracterul elastografic al acesteia. Utilitatea acesteia a crescut în ultimii ani în special pentru evaluarea ganglionară și monitorizarea pacientului cu melanom.

Rolul anatomopatologului este de asemenea fundamental în diagnosticul melanomului, fiind cel care dă informații pertinente cu privire la prezența sau absența unor factori de prognostic și a caracteristicilor tumorale cu sau fără ajutorul metodelor imunohistochimice.

Genetica tumorală este obligatorie la momentul actual în special în cazurile care necesită tratamente sistemice moderne. Conceptul de medicină personalizată este unul care a rafinat răspunsul la tratamentele moleculare noi tocmai pe baza acestor determinări genetice. Abordarea pacientului cu melanom este una multidisciplinară, iar succesul tratamentului unui pacient nu este succesul unui singur clinician, ci mai degrabă un efort colectiv.

Studiul 1. Studiu epidemiologic și clinicopatologic al melanoamelor acrale și mucoase versus melanoame cu alte localizări

Introducere și obiective : Melanomul a fost și rămâne un tip de neoplasm cu o mortalitate ridicată, în ciuda a numeroase opțiuni terapeutice din ultimii ani. În ciuda unor eforturi mari de conștientizare a acestei tumori și a campaniilor intense de screening, multe din melanoame sunt încă diagnosticate în faze tardive sau invazive, iar unele din formele sau localizările particulare pot fi ușor trecute cu vederea de către clinicieni. Obiectivul studiului nostru a fost acela de a evalua frecvența melanoamelor acrale și mucoase comparativ cu melanoamele cu alte localizări și de a compara aceste tipuri

de melanom cu caracteristicile histopatologice ale melanoamelor cu alte localizări la pacienții care s-au adresat Clinicii Dermatologie Cluj-Napoca în perioada 2005-2016.

Material și metodă: Au fost incluși în studiu 361 pacienți cu diagnostic de melanom confirmat histopatologic, dintre care 40 pacienți cu melanoame acrale și 4 pacienți cu melanoame mucoase. Au fost înregistrate date demografice și clinice ca: vârstă, sex, localizare (CSD, nonCSD, acral (palmar, plantar, aparat unghial), mucos); date histopatologice ca : subtipul histopatologic: LMM, MES, MAL, Nodular, altele (mucos); grosimea tumorii- indicele Breslow; nivelul Clark- gradul de invazie cutanată; regresia; invazia limfovasculară, perineurala; infiltratul inflamator limfocitar peri și intratumoral; prezența sau absența metastazelor. Aceste variabile au fost considerate relevante în funcție de datele prezente în literatură și de datele care au putut fi colectate din fișele de observație ale pacienților.

Rezultate: *Evaluarea caracteristicilor clinice și patologice ale pacienților cu melanom*

Vârsta medie a pacienților cu melanom acral și mucos a fost 64 ani, a pacienților cu melanoame apărute pe zone cu expunere cronică la soare (CSD) de 54 ani, a pacienților cu melanoame apărute pe zone cu expunere intermitentă la soare (non-CSD) de 53 ani. Diferența a fost înalt semnificativă statistic între pacienții cu melanoame apărute la nivel acral și mucos și cei cu melanoame apărute la nivelul zonelor cu expunere cronică sau intermitentă la soare ($p < 0,002$). În ceea ce privește subtipul histologic al tumorii, lentigo malign melanoma (LMM) a fost forma preponderentă pe zone CSD, melanomul extensiv în suprafață (MES) a fost prezent în 34,8 cazuri de melanoame apărute pe zone CSD, 62,7% din melanoamele non-CSD și 32,5% din melanoamele acrale. Forma nodulară a fost prezentă în 45,7% din melanoamele CSD, 33,2% din melanoamele pe zone non-CSD, 17,5% din melanoamele acrale și 25% din melanoamele mucoase. Subtipul histologic de melanom acral lentiginos (MAL) a fost prezent în 50% din cazurile de melanom acral.

Mediana nivelului Clark la pacienții cu melanoame CSD și non CSD a fost de III la fiecare dintre grupuri, pacienții cu melanoame acrale și mucoase au prezentat melanoame cu un nivel mediu Clark mai mare, de IV fiecare dintre grupuri, diferența între grupurile CSD /non-CSD și grupurile acral și mucos fiind semnificativă statistică ($p = 0,01$)

Invazia limfovasculară a fost prezentă în 9,4% din cazuri : 75% din melanoamele mucoase, 20% din melanoamele acrale, 8,1% din melanoamele pe zone non-CSD și 2,2% din melanoamele CSD. 90,6% din melanoame nu au prezentat invazie limfovasculară. Diferența dintre grupul melanoamelor care a prezentat invazie limfovasculară și cel fără invazie limfovasculară a fost semnificativă statistic

Infiltratul inflamator limfocitar peritumoral a fost absent în 10,8% din cazurile de melanom CSD și non-CSD, redus în 31,2% din cazuri, moderat în 40,7% din cazuri și bogat în 17,3% din cazuri. 16 din cele 25 de melanoame acrale și 2 din cele 4 melanoame mucoase evaluate au prezentat infiltrat inflamator limfocitar redus. Diferența a fost semnificativă pentru grupul de melanoame acrale ($p = 0,025$)

Infiltratul inflamator limfocitar intratumoral a fost în cazurile de melanom CSD și non-CSD absent în 71,5% din cazurile de melanom, redus în 8,6% cazuri, moderat în 12,5% din cazuri și bogat în 7,4% din cazuri. În cazurile de melanom acral, în 75% din melanoame acesta a fost absent și redus în 16,7% din cazuri. În 75% din cazurile de melanom mucos acesta a fost absent și redus în 25% din cazuri.

Concluzii: Deși melanoamele acrale și mucoase nu au fost prezente în număr foarte mare, studiul de față a identificat câțiva factori de prognostic asociați acestora, raportați în literatură ca având un rol negativ cum ar fi: vârsta, localizarea acrală și mucoasă, un indice Breslow mai mare, prezența invaziei limfovasculare și a unui infiltrat inflamator intra și peritumoral redus. Melanoamele acrale și mucoase apar mai frecvent la vârste înaintate. Localizarea acrală și mucoasă se asociază frecvent cu melanoame mai groase. Infiltratul inflamator limfocitar peritumoral redus este mai frecvent în melanoamele acrale și mucoase comparativ cu alte localizări. Melanoamele mucoase asociază mai frecvent invazie limfovasculară.

Studiu 2. Frecvența structurilor dermatoscopice definitorii pentru melanoamele acrale și mucoase și corelarea acestora cu grosimea melanomului

Introducere și obiective: Melanomul acral, o formă rară de melanom la rasa albă, este asociat cu prognostic prost comparativ cu melanoamele cutanate cu altă localizare, în special datorită diagnosticului tardiv sau greșit. Dermatoscopia s-a dovedit a fi o foarte utilă metodă de diagnostic în melanoamele acrale, în special prin identificarea unor structuri de tipul PRP (parallel ridge pattern) asociate frecvent cu acestea și diferențierea lor față de modelul șanțurilor paralele ce apare în leziunile melanocitare benigne. În literatură există raportări controversate ale structurilor dermatoscopice prezente în melanoamele acrale, Lallas și colaboratorii raportând prezența PRP în numai 38,2% din 131 de melanoame, majoritatea tumori invazive. El a arătat că peste 60% din melanoame pot fi trecute cu vederea dacă se ia în calcul doar criteriul PRP.

Obiectivul acestui studiu a fost descrierea frecvenței structurilor dermatoscopice prezente în melanoamele acrale și corelarea acestora cu grosimea tumorală măsurată prin indicele Breslow și nivelul Clark. Studiile publicate până în prezent au rezultate contradictorii privind frecvența acestor structuri asociate diagnosticului de melanom acral în diverse populații.

Material și metodă: Au fost analizate 27 cazuri de melanoame acrale confirmate histopatologic, cu documentare dermatoscopică și fotografică, 4 cazuri de melanom unghial și 4 cazuri de melanoame mucoase. S-au înregistrat date demografice și clinice pentru fiecare pacient: gen, vârstă, dimensiunea leziunii (mai mică sau mai mare de 0,7 mm, ulceratie (prezentă sau absentă) și localizare (palmar, plantar, degete). Datorită numărului mic de cazuri de melanom unghial (4 cazuri) și de mucoase (4 cazuri), acestea vor fi caracterizate separat, prin enunțarea structurilor dermatoscopice caracteristice prezente.

Caracteristicile dermatoscopice specifice analizate pentru melanoamelor acrale au fost: PRP (parallel ridge pattern) pigmentar- prezența pigmentului la nivelul crestelor epidermice, PRP (parallel ridge pattern) vascular- eritem sau vase punctate ce apar numai la nivelul crestelor epidermice și scutesc șanțurile, PFP (parallel fibrilar pattern) atipic- linii paralele ce străbat tangențial atât crestele cât și șanțurile, zone periferice focale- zone pigmentare cu localizare periferică ce nu prezintă contact cu leziunea, structuri dermatoscopice prezente și în melanoamele cutanate cu altă localizare, cum ar fi: asimetrie de structuri și culori, pattern global, zone fără structură, vâl alb-albastru, puncte și globuli neregulați, striuri neregulate, peppering, structuri vasculare ca zone roșii lăptoase sau vase polimorfe. Fiecare leziune a fost evaluată dermatoscopic de 2 investigatori diferiți. Caracteristicile histopatologice analizate au fost: Grosimea melanomului - Indicele Breslow (mm) și extinderea melanomului în piele- Nivelul Clark.

Rezultate: Vârsta medie a pacienților a fost 62,4±14,7 ani.

Analiza frecvenței structurilor dermatoscopice specifice melanoamelor acrale la pacienții din studiu: PRP pigmentar a fost prezent la 51,9% din pacienți. PFP/parallel fibrilar pattern atipic a fost prezent la 18,52% din pacienți. Zonele periferice focale au fost prezente la 29,6% din pacienți. PRP vascular a fost prezent la 22,2% din pacienți.

Analiza frecvenței structurilor dermatoscopice prezente în general în melanoamele cutanate la pacienții cu melanom acral: Vâlul alb-albastru a fost prezent la 63% din pacienți. Punctele/globulii neregulați au fost prezenți la 48,1% din pacienți. Striurile neregulate au fost prezenți la 18,5% din pacienți. Zonele cu aspect de „peppering” au fost prezente la 7,4% din pacienți. Zonele roșii lăptoase au fost prezente la 66,7% din pacienți. Vasele polimorfe au fost prezente la 63% din pacienți. Ulcerațiile au fost prezente la 55,6% din pacienți.

70,37% din pacienți au prezentat tumori localizate la nivel plantar, 22,22% interdigital și degete și 7,40% la nivelul liniei Wallace, o linie imaginară ce delimitează fața dorsală mâinii și picioarelor de zona palmo-plantară. 44,3% din pacienți au prezentat melanoame acrale lentiginose, 37% pacienți au prezentat

melanoame extensive în suprafață și 18,5% au prezentat forme nodulare la evaluarea histopatologică a leziunilor.

Mediana indicelui Breslow la pacienții cu PRP pigmentar a fost 1,85 mm, iar la cei fără PRP pigmentar a fost 3 mm. Diferența a fost semnificativă statistic ($p=0,01$). Mediana indicelui Breslow la pacienții cu PFP atipic a fost 1,5 mm, iar la cei fără PFP atipic a fost 2,9 mm, diferența fiind semnificativă statistic ($p=0,05$). Melanoamele acrale care au prezentat zone periferice focale au prezentat o mediană a indicelui Breslow de 1,85mm, iar cele fără zone periferice focale 3mm, diferența fiind semnificativă statistic. Nu s-au înregistrat diferențe semnificative din punct de vedere statistic pentru structurile dermatoscopice prezente în general în melanom, cum ar fi vâlul alb-albastru, puncte/globuli neregulați, striuri neregulate, peppering. În ceea ce privește structurile vasculare, cum ar fi zonele roșii lăptoase și vasele polimorfe, acestea au fost asociate cu o mediană a indicelui Breslow de 2,95mm, respectiv 3mm comparativ cu melanoame acrale ce nu prezentau aceste structuri, cu o mediana a indicelui Breslow de 0,4mm, respectiv 0,75mm. Diferența între grupuri a fost semnificativă statistic. Ulcerația a fost caracteristică melanoamelor mai groase cu o mediană a indicelui Breslow de 2,8mm comparativ cu cele fără ulcerație cu o mediană a indicelui Breslow de 0,9mm, diferența între grupuri fiind semnificativă statistic ($p=0,02$).

La nivelul aparatului unghial s-a constatat prezența unei pigmentații unghiale neuniforme, sub formă de linii paralele, cu o grosime ce a depășit 3 mm, cu aspect triunghiular al pigmentației și prezența semnului Hutchinson într-un singur caz, la nivelul policelului. Hemoragia subunghială a fost prezentă în 3 din cele 4 cazuri, iar distrucția unghială, în toate. Zonele periferice focale, au fost prezente într-un singur caz. Vasele polimorfe și zonele roșii lăptoase au fost prezente în două din cele patru cazuri. Două melanoame au prezentat subtipul histologic de melanom nodular și două melanom acral lentiginos.

Pacienții cu melanoame mucoase au avut peste 60 ani. Structurile dermatoscopice observate la nivelul acestora au fost: prezența culorilor albastru/roșu, pigmentația difuză neregulată, vâlul alb albastru, prezența regresiei, întreruperea bruscă a pigmentului la marginea leziunii, zone fără structură, zone roșii lăptoase, Crisalys.

Concluzii: Melanoamele acrale cu indice Breslow mai mic în studiul nostru au prezentat o asociere cu modele dermatoscopice de tipul PRP pigmentar, PFP atipic și zone periferice pigmentare focale. Vasele polimorfe, zonele roșii lăptoase și ulcerația au fost caracteristicile melanoamelor acrale mai groase. PRP vascular, deși identificat ca un nou tip de model dermatoscopic asociat melanoamelor acrale nu a putut fi asociat cu melanoame acrale subțiri sau groase, fiind mai mult un caracteristică descriptivă decât una cu semnificație statistică în melanoamele acrale din acest studiu.

Studiu 3. Corelații dermatoscopice, ultrasonografice și imunohistochimice în melanoamele acrale

Introducere și obiective: Creșterea și vascularizația tumorală crescută alături de factori histologici (grosimea tumorii sau indicele Breslow, nivelul Clark sau rata mitotică) s-au dovedit a avea un rol important în predicția riscului de metastazare. Ultrasonografia Doppler, alături de dermatoscopie și examinarea clinică crește acuratețea diagnostică și îmbunătățește managementul melanomului.

Scopul acestui studiu a fost corelarea anumitor structuri dermatoscopice observate în melanoamele acrale cu modificări ultrasonografice ale vascularizației tumorale și anumiți parametri imunohistochimici care au evaluat angiogeneza și limfangiogeneza.

Material și metodă: Studiul de față a fost unul observațional, analitic, prospectiv, transversal și de cohortă. Au fost incluși în studiu 10 pacienți diagnosticați cu melanom acral primar, care s-au prezentat în Departamentul de Dermatologie al Spitalului Clinic de Urgență Cluj-Napoca în perioada ianuarie 2014-noiembrie 2016 pentru diagnostic și tratament. Studiul a avut aprobarea Comisiei de Etică a Universității

de Medicină și Farmacie Cluj-Napoca nr 170/12.05.2014. Înainte de includerea în studiu toți pacienții au semnat un consimțământ informat.

Structurile dermatoscopice analizate au fost PRP la nivelul leziunii sau numai în periferie, pigmentația difuză neregulată, structuri vasculare (model vascular polimorf, zone/globuli roșu-lăptos, vase liniare neregulate, vase corkscrew (în tirbușon) Fiecare leziune tumorală a fost evaluată prin ultrasonografie de înaltă frecvență (US) înainte de excizia chirurgicală cu ajutorul unui transductor liniar de 8-40 în plan longitudinal și transversal fără a se exercita compresia asupra leziunii care să altereze fluxul sangvin. S-a apreciat aspectul vascularizației și s-au înregistrat pentru fiecare tumoră numărul de pediculi vasculari prezenți la nivelul leziunii. Pentru evaluarea elasticității tumorale s-a utilizat elastografia calitativă în timp real, în raport cu țesutul peritumoral normal. La toți pacienții s-a efectuat excizia chirurgicală cu evaluare histopatologică și imunohistochimică a leziunilor tumorale și toți au fost tratați conform stadializării propuse de AJCC Melanoma Staging and Clasification 2009. Pentru detectarea structurilor vasculare tumorale și peritumorale - MVD (densitatea vasculară microscopică)- s-au utilizat anticorpi pentru markeri vasculari VEGFR-2 1:50 (policlonal, Abcam) și CD34 1:100 (Qbend 10, Immunologic), iar pentru LVD (densitatea vaselor limfatice) s-a utilizat D2-40 1:25 (Abcam). Pentru evaluarea proliferării tumorale s-a efectuat colorație imunohistochimică care să deceleze Cyclin D1 cu ajutorul anticorpilor Cyclin D1 1:40 (P2D11F11, Novocastra) și ki67 1:600 (MYB1, Immunologic). Toate colorațiile imunohistochimice s-au efectuat automat cu ajutorul aparatului Ventana, Roche Bench Mark Ultra, HIER CC1 cu kit de detecție optică și ultra view roșu. Analiza și cuantificarea preparatelor imunohistochimice s-a efectuat cu ajutorul microscopului Olympus BX43.

Rezultate: Vârsta mediană a pacienților a fost 62 ani. 40% din pacienți au fost de sex masculin și 60% pacienți de sex feminin. Mediana indicelui Breslow a fost de 4,25 mm. Evaluarea dermatoscopică a demonstrat prezența în majoritatea melanoamelor acrale (80% din cazuri) a unui pattern vascular polimorf, cea mai remarcabilă structură vasculară fiind zonele/globulii roșu lăptos. 20% din melanoamele acrale nu au prezentat sau au prezentat foarte puține vase vizibile. La aceste tumori componenta pigmentară a fost mai evidentă. La examinarea ultrasonografică de înaltă frecvență toate melanoamele au avut aspect hipoecogen. 60% au prezentat un aspect omogen și 40% au fost inomogene. În 20% melanoame nu s-a pus în evidență prezența structurilor vasculare, acestea fiind moi la examinarea elastografică în timp real, iar 80% din melanoame au prezentat mai mult de doi pediculi vasculari, având un aspect rigid, dur, la examinarea elastografică în timp real. Melanoamele care au prezentat un modelul vascular polimorf ce a inclus structuri de tip zone sau globuli roșu lăptos au fost asociate cu tumori hipervascularizate ultrasonografic. A existat o corelație semnificativă statistic ($p=0,02$) între prezența zonelor/globulilor roșu lăptos și tumorile hipervascularizate cu mai mult de doi pediculi la examinarea Doppler. Aceste tumori au avut și un aspect rigid la elastografia în timp real, asociere de asemenea semnificativă statistic ($p=0,02$). Grosimea medie a tumorilor la examinarea ultrasonografică a fost de 4,5 mm, în concordanță cu indicele Breslow mediu măsurat histopatologic.

Analiza imunohistochimică a preparatelor histologice nu a arătat o corelație între MVD intratumoral sau peritumoral și prezența vaselor ultrasonografic sau dermatoscopic. MVD nu a influențat nici aspectul elastografic al tumorilor la examinarea elastografică în timp real. Mediana determinării LVD la analiza imunohistochimică a fost 1.87 intratumoral și 3.5 peritumoral. Absența modelului vascular polimorf la examinarea dermatoscopică care a inclus și zone/globuli roșu lăptos s-a corelat ($p=0.05$) cu lipsa sau prezența a foarte puține LVD intratumoral și o densitate crescută a LVD peritumoral. Modelul vascular polimorf ce include zonele/globulii roșu lăptos observat la examinarea dermatoscopică a fost asociat cu tumorile hipervascularizate la examinarea ultrasonografică, tumori dure, rigide la examinarea elastografică în timp real și o densitate LVD crescută intratumoral la evaluarea imunohistochimică. Tumorile hipervascularizate, cu mulți pediculi vasculari la examinarea ultrasonografică s-au corelat cu densitatea vaselor limfatice intratumoral.

Concluzii: Studiul nostru, deși a fost efectuat pe un număr mic de pacienți a arătat că prezența structurilor dermatoscopice de tipul zone/globuli roșu lăptos și a modelului vascular polimorf în

melanoamele acrale este asociată cu hipervascularizație tumorală la examinarea ultrasonografică, cu rigiditate tumorală la elastografia în timp real și de asemenea, cu densitate crescută a vaselor limfatice intratumoral și o tendință a acestor melanoame de a exprima Ciclin D1.

Studiul 4. Modificări genetice în melanoamele acrale primare și nevii melanocitari acrali versus melanoamele primare și nevii melanocitari dezvotate pe zone fotoexpuse–studiu comparativ pilot NGS Ion Torrent

Introducere și obiective: Melanomul acral este o tumoră unică din punct de vedere clinic, histologic și molecular în spectrul melanoamelor. Spre deosebire de melanoamele cutanate, în etiologia melanoamelor acrale nu este implicată expunerea la radiația UV, acestea au un număr mai mic de mutații punctiforme și o frecvență mai mare a numărului de copii alterate. Melanoamele acrale au un profil mutațional diferit față de melanoamele cutanate. Căile de mutageneză descrise în melanom sunt multiple, apariția melanomului fiind un proces mai complex de interacțiuni între aceste căi la care se adaugă factori de mediu și factori care țin de pacient. În melanoamele acrale nu s-a descoperit un driver mutagen major cum este radiația UV în cazul melanoamelor pe zone fotoexpuse. Trauma sau tensiunea fizică au fost propuși ca factori implicați în etiopatogeneza melanoamelor acrale, dar o asociere clară nu a fost demonstrată. Deși apariția melanoamelor acrale pe nevii melanocitari acrali este un eveniment neobișnuit, prezența nevilor melanocitari acrali multipli a fost identificată ca factor de risc în apariția melanoamelor acrale.

Studiul de față își propune prin utilizarea unor metode noi de secvențiere de nouă generație o analiza mutațională comparativă a unor melanoame acrale în comparație cu nevii acrali, melanoamele cutanate cu localizare pe zone fotoexpuse și nevii melanocitari pe zone fotoexpuse.

Material și Metodă: Selecția pacienților și adunarea datelor Au fost incluși aleator în studiu 16 pacienți diagnosticați și tratați în Clinica Dermatologie Cluj-Napoca, în funcție de ordinea prezentării și acceptarea participării în studiu. Dintre aceștia, 4 pacienți cu diagnostic de melanom acral MMA, 4 pacienți cu diagnostic de nev acral NA, 4 pacienți cu diagnostic de melanom pe zonă cu expunere intermitentă la soare (trunchi) MMT și 4 pacienți cu nevi la nivelul trunchiului NT, care s-au prezentat la control în perioada ianuarie 2016-decembrie 2018. Toți pacienții au fost de etnie română, caucazieni, au avut vârsta peste 18 ani și au semnat consimțământul informat. De la fiecare pacient s-au înregistrat date clinice și demografice, date histopatologice și date genetice obținute prin secvențiere NGS cu ajutorul Ion Torrent “ Personal Genome Machine”, Life Technologies în 2011. S-a efectuat extracția ADN-ului din țesuturile încorporate în parafină fixată în formalină (FFPE) folosind PureLink™ Genomic DNA Mini Kit de la Invitrogen. **Cuantificarea ADN-ului:** Cantitatea de ADN care a fost obținută în timpul protocolului de extracție și purificare a fost cuantificată cu spectrofotometrul NanoDrop-1000 (Thermo Scientific). **Pregătirea bibliotecilor de ampliconi:** Pentru fiecare probă, biblioteca de ampliconi a fost pregătită urmând strict protocolul producătorului, folosind o serie de kituri Ion AmpliSeq de la Applied Bioscience. **Amplificarea ADN-ului genomic cu primeri specifici:** Amplificarea ADN-ului genomic a fost efectuată folosind kitul „Ion Ampliseq Cancer Hotspot Panel v2” de la Applied Bioscience, care conține primeri pentru 50 de gene despre care se știe că prezintă mutații cu implicație în cancer (*ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, EZH2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAS, GNAQ, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53, and VHL*). **Digestia parțială a amorsoarelor:** Pentru a continua cu sinteza bibliotecilor, amorsoarele utilizate pentru amplificarea genelor țintă trebuie îndepărtate. **Legarea codurilor de bare și a adaptorilor:** După digestia amorsoarelor se adaugă codurile de bare și adaptorii care permit secvențierea multiplex cu instrumentul Ion Torrent.

Purificarea ampliconilor: Etapa de purificare este necesară pentru a elimina ADN-ul genomic rămas și primerii neatașați, și pentru a asigura calitatea înaltă a ampliconilor, necesară pentru etapele ulterioare ale protocolului de secvențiere. **Purificarea bibliotecilor:** Etapa de purificare este necesară pentru a elimina ADN-ul genomic rămas și primerii neatașați, și pentru a asigura calitatea înaltă a ampliconilor, necesară pentru etapele ulterioare ale protocolului de secvențiere. **Cuantificarea bibliotecilor:** Cuantificarea bibliotecilor a fost realizată folosind fluorometrul Qubit 2.0 și kitul Qubit dsDNA HS. **Sinteza matritelor:** Patru biblioteci diferite diluate la 100pM au fost utilizate pentru sinteza matritelor de secvențiere. **Îmbogățirea ISP și încărcarea ISP-urile pe cipul de secvențiere.**

Rezultate: Au fost identificate 171 de mutații missense, 10 mutații nonsense, 1 mutație tip deleție cu schimbarea cadrului de citire și o mutație tip deleție fără schimbarea cadrului de citire. Din totalul de 74 mutații patogene 21 poartă semnătura radiației UV (1 mutație MMA, 11 mutații NA, 6 mutații MMT și 3 mutații NT). Cele mai multe gene mutate comune (20 gene) au fost în grupul NA/NT. Grupul NA conține cele mai multe gene mutate, urmat de grupul NT. Dintre genele frecvent mutate în grupul NA fac parte gena ATM, RB1, IDH2, TP53. În cadrul grupului MMA genele cu un număr mai ridicat de mutații au fost ABL1 și KIT, iar gene cu mai mult de o mutație sunt APC, FLT3 și RB1. Caracteristicile genelor mutate:

Gena KIT- au fost identificate 17 mutații, majoritatea patogene în exonii 10,11,17 și una în exonul 13, cu distribuție în toate grupurile de studiu.

Gena RB1- prima genă supresoare tumorală identificată ce intervine în melanom pe calea CDK4/CDKN2A, alături de p53. S-au identificat în studiu 15 mutații somatice RB1: 2 în grupul MMA necaracterizate și opt, dintre care 3 patogene în grupul NA.

Gena IDH1- raportată în subtipul de melanom triplu negativ. A prezentat în studiu 3 mutații patogene la grupurile MMA, NA, NT. Această genă definește o categorie aparte de pacienți cu melanom ce poate dobândii terapii țintite IDH1 sau terapii combinate IDH1/MEK atunci când coexistă cu mutații NRAS.

Gena ABL1- e implicată în procesele de diferențiere și diviziune celulară, progresie tumorală și metastazare. S-au identificat în studiu 6 mutații somatice, 4 în grupul MMA, dintre care 2 mutații patogene.

Gena FLT3- promovează activarea căii de semnalizare RAS, proliferarea celulară și rezistența la apoptoză. În studiu s-au identificat 9 mutații somatice, dintre care două în grupul MMA.

Gena PTPN11- are rol în tumorigeneză prin activarea căii RAS/RAF/MAPK și reglează β -cateninele și Ciclin D1. Poate fi o țintă terapeutică în melanoamele BRAF tipul sălbatic. În studiu s-au identificat 5 mutații somatice în grupurile MMA și NA, dintre care 3 patogene.

Gena FGFR2- influențează mitogeneza și diferențierea celulară, precum și procesele de neoangiogenează. În melanoamele tratate cu inhibitori BRAF/MEK, atunci când se blochează această cale, semnalizarea pe calea FGF/FGFR poate fi unul din mecanismele care duc la dezvoltarea rezistenței la tratamentul BRAF/MEK. În studiul nostru s-au decelat 3 mutații somatice în grupurile MMA, NA; dintre care 2 patogene.

Concluzii: În genetica tumorală a melanomului rămân multe lacune de cunoștințe critice, de aceea este necesară o caracterizare moleculară cât mai completă a diferitelor subtipuri de melanom, inclusiv a melanomului acral și a leziunilor melanocitare benigne, pentru o mai bună înțelegere a interacțiunii dintre gene și o clarificare a evenimentelor moleculare care stau la baza comportamentului agresiv a unora dintre acestea.

Concluzii generale

1. Evaluarea frecvenței melanoamelor acrale și mucoase și a caracteristicilor histopatologice ale acestor subtipuri de melanom a identificat câțiva factori de prognostic asociați și raportați în literatură ca având un rol negativ, cum ar fi: vârsta, localizarea acrală și mucoasă, un indice Breslow mai mare, prezența invaziei limfovaskulare și a infiltratului inflamator intra și peritumoral redus.

2. Structurile dermatoscopice definitorii pentru melanoamele acrale și mucoase au prezentat o asociere semnificativă statistic cu indicele Breslow (grosimea melanomului). Modelele dermatoscopice de tipul PRP pigmentar, PFP atipic și zone periferice pigmentare focale au prezentat asociere cu un indice Breslow mai mic fiind caracteristice melanoamelor acrale subțiri, iar vasele polimorfe, zonele roșii lăptoase și ulcerarea au fost caracteristicile melanoamelor cu indice Breslow mare, mai groase.

3. Anumite structuri dermatoscopice observate în melanoamele acrale au fost corelate cu modificări ultrasonografice ale vascularizației tumorale și anumiți parametri imunohistochimici care au evaluat angiogeneza și limfangiogeneza. Studiul nostru a arătat că prezența structurilor dermatoscopice de tipul zone/globuli roșu lăptos și a modelului vascular polimorf în melanoamele acrale este asociată cu hipervascularizație tumorală la examinarea ultrasonografică, cu rigiditate tumorală la elastografia în timp real și de asemenea, cu densitate crescută a vaselor limfatice intratumoral și o tendință a acestor melanoame de a exprima Ciclin D. Rezultatele studiului de față vor trebui validate de studii pe loturi mai mari de pacienți.

4. Studiul genetic a identificat și evidențiat anumite gene caracteristice unui subtip aparte de melanom (triplu negativ), a întărit datele din literatură cu privire la numărul de mutații somatice în melanoamele acrale versus alte forme de melanom. Genetica tumorală a melanomului este foarte complexă, însă rămân multe lacune de cunoștințe critice. Rezultatele studiului nostru vor trebui validate pe loturi mai mari de pacienți.

Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei

În cadrul lucrării de față am încercat o evaluare complexă a unor subtipuri rare de melanom, reprezentate de melanoamele acrale și mucoase, melanoame ce sunt asociate cu un prognostic mai prost ca alte subtipuri de melanom. Singura modalitate de îmbunătățire a prognosticului acestora este identificarea precoce, de preferat prin metode neinvazive, având în vedere localizarea particulară, în zone anatomice dificile.

PHD THESIS SUMMARY

Epidemiological, clinical and investigative study of acral and mucosal melanomas

Phd student **Lavinia Elena Rostogol (Grigore)**

Phd supervisor **Prof.dr. Rodica Cosgarea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION.....	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	17
1. Acral and mucosal melanomas - epidemiology, risk factors and clinical presentation.....	19
1.1. Epidemiology of melanoma	19
1.1.1. Epidemiology of acral melanomas 19	
1.1.2. Epidemiology of mucosal melanomas.....	20
1.2. Anatomical and topographic distribution of acral and mucosal melanomas.....	20
1.2.1. Risk factors for developing melanoma.....	21
1.3.1. The role of germline mutations in melanoma.....	21
1.3.1.1The role of the nevus phenotype in melanoma.....	21
1.3.2 The role of somatic mutations in melanoma.....	22
1.3.3. The role of extrinsic factors in the occurrence of melanoma.....	22
1.3.3.1. Ultraviolet radiation.....	22
1.3.3.2 Trauma and pressure areas.....	22
1.3.3.3. Exposure to carcinogens.....	23
1.3.3.4. Infectious factors.....	23
1.4. The clinical spectrum of acral and mucosal melanomas.....	23
1.4.1 The clinical spectrum of primary acral melanomas.....	23
1.4.2 The clinical spectrum of primary melanomas of the nail apparatus.....	24
1.4.3 The clinical spectrum of primary mucosal melanomas.....	24
1.4.3.1. Mucous melanomas of the head and neck.....	24
1.4.3.2. Vulvovaginal mucosal melanomas.....	25
1.4.3.3. Anorectal mucosal melanomas.....	25
1.5.. Clinical algorithms for diagnosis of acral and mucosal melanomas.....	25
1.5.1. ABCDE criteria for the diagnosis of primary cutaneous melanoma regardless of location.....	25
1.5.1.1. Clinical criteria for the diagnosis of plantar acral melanomas.....	26
1.5.1.2. ABCDEF criteria for the diagnosis of subungual melanomas.....	26
1.5.1.3. Additional ABCD criteria for the diagnosis of melanoma.....	27
1.5.1.4.The value and effectiveness of ABCDE criteria.....	27
1.5.2. The Ugly duckling sign.....	28
1.5.3. Glasgow 7-point checklist.....	28
1.5.4. Clinical Imaging Training - The Role of Convolutional Neural Networks.....	28
2. The role of noninvasive imaging methods in evaluation of acral and mucosal melanomas.....	29
2.1. The role of dermoscopy in the evaluation of pigment lesions.....	29
2.1.1. The role of dermoscopy in the diagnosis of palmoplantar melanomas.....	30
2.1.1.1.Dermoscopic patterns associated with benign acral melanocytic lesions.....	30
2.1.1.2.Dermoscopic patterns associated with acral melanoma.....	31
2.1.1.3.Benign acral disorders that dermoscopically mimic malignancy.....	32
2.1.1.4.Dermoscopic diagnostic algorithms for acral melanomas.....	32
2.1.2. The role of dermoscopy in the diagnosis of nail melanomas.....	33
2.1.2.1.Dermoscopic examination of the nail apparatus.....	33
2.1.2.2..Dermoscopy of the nail plate free edge.....	33
2.1.2.3. Non-melanocytic nail pigmentation.....	34
2.1.2.4. Melanocytic nail pigmentation due to activation of melanocytes.....	34
2.1.2.5. Melanocytic nail pigmentation due to melanocyte proliferation.....	35
2.1.3. The role of dermoscopy in the diagnosis of mucosal melanomas.....	36
2.1.3.1.Dermoscopic patterns associated with mucosal melanocytic lesions.....	36
2.1.3.2.Diagnostic algorithms for mucosal melanomas.....	36
2.2. Cutaneous ultrasonography.....	37
2.2.1.Ultrasonography of primary cutaneous melanomas.....	37

3. Histopathology and molecular biology of acral and mucosal melanomas.....	39
3.1. The main histological subtypes of melanoma.....	39
3.2. Melanomas associated with the epithelium.....	39
3.2.1. Molecular changes in melanomas associated with chronic sun exposure.....	40
3.2.2. Molecular changes in melanomas associated with intermittent sun exposure.....	40
3.2.3. Molecular changes in melanoma of glabrous skin.....	40
3.2.4. Molecular changes in mucosal melanomas.....	40
3.3. Melanomas not associated with epithelium.....	41
3.4. Genes involved in the appearance of acral melanomas.....	41
3.4.1. KIT.....	41
3.4.2. CCND1.....	41
3.4.3. BRAF și NRAS.....	42
3.4.4. CDKN2A.....	42
3.4.5. TERT și AURKA.....	42
3.4.6. NUA2.....	43
3.5. Cellular pathways with a role in the pathogenesis of melanoma.....	43
3.5.1. MAPK pathway.....	43
3.5.2. PI3K/AKT/PTEN pathway.....	43
3.5.3. JAK/STAT3 pathway.....	43
3.5.4. TERT pathway.....	43
3.5.5. CDK4/CDKN2A pathway.....	43
3.5.6. MDM2/TP53 pathway.....	44
3.5.7. WNT signaling.....	44
3.5.8. MCR1-MITF pathway.....	44
3.6. Conclusions.....	44
PERSONAL CONTRIBUTION	45
1. Work hypothesis and objectives.....	47
2. Methodology.....	49
3. Study 1. Epidemiological and clinicopathological study of acral and mucosal melanomas versus melanomas on other locations.....	51
3.1. Introduction.....	51
3.2. Objectives.....	51
3.3. Patients and method.....	51
3.4. Results.....	51
3.5. Discussions.....	51
3.6. Conclusions.....	51
4. Study 2. Frequency of dermoscopic structures defining acral and mucosal melanomas and their correlation with melanoma thickness.....	63
4.1. Introduction.....	63
4.2. Objectives.....	63
4.3. Patients and method.....	63
4.4. Results.....	65
4.5. Discussions.....	80
4.6. Conclusions.....	83
5. Study 3. Dermoscopic, ultrasonographic and immunohistochemical correlations in acral melanomas.....	85
5.1. Introduction.....	85
5.2. Objectives.....	85
5.3. Patients and method.....	85
5.4. Results.....	87
5.5. Discussions.....	96
5.6. Conclusions.....	98
6. Study 4. Genetic changes in primary acral melanomas and acral melanocyte nevi versus primary melanomas and melanocytic nevi developed on photoexposed areas – a pilot comparative NGS Ion Torrent study	99
6.1. Introduction.....	99
6.2. Objectives.....	99
6.3. Patients and method.....	100
6.4. Results.....	106

6.5. Discussions.....	117
6.6. Conclusions.....	119
7. FINAL CONCLUSIONS.....	121
8. Originality of research and innovative contribution.....	123
9. References.....	125

Keywords: acral melanoma, mucosal melanoma, dermoscopy, ultrasonography, immunohistochemistry, NS Ion Torrent, genetic changes.

INTRODUCTION

Melanoma is one of the skin cancers with a growing incidence, especially in Western countries, where sustained efforts have been made to educate the population through screening and prevention campaigns. Melanoma is not only a tumour of the skin, but also a tumour of the mucous membranes.

Melanoma with special locations such as those at the acral level: palmar, plantar or nail apparatus and mucosal forms, are forms that have not received the attention of education, screening or prevention campaigns. The location of melanomas in these areas puts the patient sometimes in an awkward situation during the clinical examination. For this reason, they are neglected for a long time, the presentation to the doctor is made in late stages, and the prognosis is unfavourable.

Dermoscopy, and more recently digital videodermoscopy, are non-invasive diagnostic methods that allow images to be stored and compared over time. This can lead to early, timely changes for the patient. Ultrasonography is also a diagnostic method that can give real-time details about the vascularization of the tumour and its elastographic features. Its usefulness has increased in recent years, especially for lymph node assessment, but also for monitoring of the patient with melanoma.

The role of the pathologist is fundamental in the diagnosis of melanoma, being the one who gives relevant information about the presence or absence of prognostic factors and tumour characteristics with or without the help of immunohistochemical methods.

Tumour genetics is currently mandatory, especially in cases that require modern systemic treatments. The concept of personalized medicine is one that has refined the response to new molecular treatments precisely on the basis of these genetic determinations. The approach of the patient with melanoma is a multidisciplinary one, and the success of a patient's treatment is not the success of a single clinician, but rather a collective effort.

Study 1. Epidemiological and clinicopathological study of acral and mucosal melanomas versus melanomas on other locations

Introduction and objectives : Melanoma has been and remains a type of neoplasm with a high mortality rate, despite numerous treatment options in recent years. Despite great efforts to raise awareness of this tumor and intense screening campaigns, many melanomas are still diagnosed in late or invasive stages, and some of the particular forms or locations can be easily overlooked by clinicians. The aim of our study was to evaluate the frequency of acral and mucosal melanomas compared to melanomas arising on other locations and to compare the histopathological characteristics these types of melanoma in patients admitted to the Cluj-Napoca Dermatology Clinic during 2005-2016.

Patients and method: The study included 361 melanoma patients, with histopathological confirmation of diagnosis, of which 40 patients with acral melanomas and 4 patients with mucosal melanomas. Demographic and clinical data were recorded as: age, sex, location (CSD, nonCSD, acral (palmar, plantar, nail apparatus), mucous); histopathological data as: histopathological subtype-LMM, MES, MAL, Nodular, others (mucous); tumor thickness - Breslow index; Clark level - degree of skin invasion; regression; lymphovascular, perineural invasion; intratumoral and around the tumor lymphocytic inflammatory infiltrate; the presence or absence of metastases. These variables were considered relevant based on the data in the literature and the data that could be collected from the patient observation sheets.

Results: *Evaluation of the clinical and pathological characteristics of patients with melanoma*

The mean age of patients with acral and mucosal melanoma was 64 years, of patients with melanoma arising in areas with chronic sun exposure (CSD) was 54 years, and in patients with melanoma arising in areas with intermittent sun exposure (non-CSD) was 53 years. The difference was highly statistically significant between patients with acral and mucosal melanomas and those with melanomas arising on areas with chronic or intermittent sun exposure ($p < 0,002$). Regarding the histological subtype of the tumor, lentigo malignant melanoma (LMM) was the predominant form on CSD areas and superficial spreading melanoma (SSM) was present in 34.8% cases of melanomas arising on CSD areas, 62.7% of non-CSD melanomas and 32.5% of acral melanomas. The nodular form was present in 45.7% of CSD melanomas, 33.2% of non-CSD melanomas, 17.5% of acral melanomas and 25% of mucosal melanomas. Acral lentiginous melanoma (ALM) histologic subtype was present in 50% of cases of acral melanoma.

The median Clark level in patients with CSD and non-CSD melanomas was III in each of the groups. Patients with acral and mucosal melanomas had melanomas with a higher average Clark level, IV in each of the groups, the difference between CSD / non-CSD groups and the acral and mucosal groups being statistically significant ($p = 0,01$).

Lymphovascular invasion was present in 9.4% of cases: 75% of mucosal melanomas, 20% of acral melanomas, 8.1% of non-CSD melanomas and 2.2% of CSD melanomas. 90.6% of melanoma cases did not show lymphovascular invasion. The difference between the group of melanomas that showed lymphovascular invasion and the one without lymphovascular invasion was statistically significant.

Peritumoral lymphocytic inflammatory infiltrate was absent in 10.8% of cases of CSD and non-CSD melanoma, reduced in 31.2% of cases, moderate in 40.7% of cases and rich in 17.3% of cases. 16 of the 25 acral melanomas and 2 of the 4 mucosal melanomas evaluated showed reduced inflammatory lymphocytic infiltrate. The difference was significant for the group of acral melanomas ($p = 0,025$).

Intratumoral lymphocytic inflammatory infiltrate was absent in 71.5% of melanoma cases arising on CSD/non-CSD skin, reduced in 8.6% of cases, moderate in 12.5% of cases and rich in 7.4% of cases. In 75% cases of acral melanomas the intratumoral lymphocytic inflammatory infiltrate was absent and reduced in 16,7% cases. This was absent in 75% of mucosal melanoma cases and reduced in 25% of cases.

Conclusions: Although acral and mucosal melanomas were not present in large numbers, the present study identified several prognostic factors reported in the literature as having a negative prognostic role such as: age, acral and mucosal location, a higher Breslow index, the presence of lymphovascular invasion and a reduced intra and peritumoral inflammatory infiltrate. Acral and mucosal melanomas occur more frequently in old age population. The acral and mucosal location is often associated with thicker melanomas. Reduced peritumoral inflammatory lymphocytic infiltrate is more common in acral and mucosal melanomas compared to melanomas arising on other locations. Mucosal melanomas are more commonly associated with lymphovascular invasion.

Study 2. Frequency of dermoscopic structures defining acral and mucosal melanomas and their correlation with melanoma thickness

Introduction and objectives: Acral melanoma, a rare form of melanoma in the white population, is associated with poor prognosis compared to cutaneous melanomas arising on another locations, especially due to late or misdiagnosis. Dermoscopy has proven to be a very useful diagnostic tool for acral melanomas, especially by identifying PRP (parallel ridge pattern) structures characteristic of acral melanomas, and differentiating them from the parallel furrow pattern that appear in benign melanocytic lesions.

There are controversial reports in the literature regarding the dermoscopic structures present in acral melanomas. Lallas et al reported the presence of PRP in only 38.2% of 131 melanomas, most of them invasive tumours. He reported that over 60% of melanomas can be overlooked if only the PRP criterion is taken into account.

The aim of this study was to describe the frequency of dermoscopic structures present in acral melanomas and their correlation with tumour thickness, measured by the Breslow index and the Clark level of invasion. Studies published to date have contradictory results on the frequency of these structures associated with the diagnosis of acral melanoma in various populations.

Patients and method: 27 cases of histopathologically confirmed acral melanomas with dermoscopic and photographic documentation, 4 cases of nail melanoma and 4 cases of mucosal melanomas were analysed. Demographic and clinical data were recorded for each patient: gender, age, size of the lesion (less than or greater than 0.7 mm), ulceration (present or absent) and location (palmar, plantar, fingers). Due to the small number of nail melanoma cases (4 cases) and mucosal melanoma (4 cases), they will be characterized separately, by describing the dermoscopic structures present.

Specific dermoscopic structures for acral melanomas were analysed: pigmented PRP (parallel ridge pattern) - the presence of pigment in the epidermal ridges, vascular PRP (parallel ridge pattern) - erythema or dotted vessels present only in the epidermal ridges and not in the furrows, atypical PFP (parallel fibrillar pattern)- parallel lines that tangentially cross both ridges and furrows, focal peripheral pigmented areas - pigmented areas with peripheral location that does not come into contact with the lesion; dermoscopic structures present in other cutaneous melanomas, such as: asymmetry of structures and colours, global pattern, structureless areas, blue-white veil, irregular dots and globules, irregular streaks, peppering, vascular structures such as milky red areas or polymorphic vessels. Each lesion was dermoscopically evaluated by 2 different investigators. The histopathological features analysed were: Melanoma thickness - Breslow index (mm) and Clark level of cutaneous involvement.

Results: The mean age of the patients was 62.4 ± 14.7 years.

The frequency of dermoscopic structures, specific to acral melanomas, analysed in the study was : Pigmentary PRP was present in 51.9% of melanoma patients. Atypical PFP (parallel fibrillar pattern) was present in 18.52% of patients. Focal pigmented peripheral areas were present in 29.6% of patients. Vascular PRP was present in 22.2% of patients.

The frequency of dermoscopic structures generally present in cutaneous melanomas analysed in the patients with acral melanoma: The blue-white veil was present in 63% of patients. Irregular dots / globules were present in 48.1% of patients. Irregular streaks were present in 18.5% of patients. "Peppering" areas were present in 7.4% of patients. Milky red areas were present in 66.7% of patients. Polymorphous vascular pattern was present in 63% of patients. Ulcerations were present in 55.6% of patients.

70.37% of patients presented tumours located at the plantar level, 22.22% on interdigital and fingers areas and 7.40% at the level of Wallace line, an imaginary line that delineates the dorsal part of hands and feet from the palmo-plantar area. On histopathological evaluation of the lesions 44.3% of the patients

presented with acral lentiginous melanomas, 37% of the patients presented with superficial spreading melanomas and 18.5% presented nodular forms of melanoma.

The median Breslow's index in patients with pigmentary PRP was 1.85 mm and in those without pigmentary PRP it was 3 mm. The difference was statistically significant ($p = 0.01$). The median Breslow index in patients with atypical PFP was 1.5 mm, and in those without atypical PFP it was 2.9 mm, the difference being statistically significant ($p = 0,05$). Acral melanomas with focal peripheral pigmented areas had a Breslow index median of 1.85 mm and those without focal peripheral areas had a Breslow index median of 3 mm, the difference being statistically significant. There were no statistically significant differences for dermatoscopic structures generally present in melanoma, such as blue-white veil, irregular spots/globules, irregular streaks, peppering. As for vascular structures, such as milky red areas and polymorphous vessels, these were associated with a Breslow index median of 2.95mm and 3mm respectively, compared with acral melanomas that did not have these structures and presented a Breslow index median of 0.4mm and 0.75mm respectively. The difference between the groups was statistically significant. Ulceration was characteristic for thicker melanomas with a median Breslow index of 2.8 mm compared to those without ulceration with a median Breslow index of 0.9 mm, the difference between groups being statistically significant ($p = 0.02$).

On the nail apparatus, the presence of a non-uniform nail pigmentation was noted, such as parallel lines, with a thickness exceeding 3 mm, a triangular appearance of pigmentation and the presence of the Hutchinson sign in one case, at the level of the thumb. Subungual haemorrhage was present in 3 of the 4 cases, and nail destruction in all. Focal peripheral areas were present in only one case. Polymorphous vessels and milky red areas were present in two of the four cases. Regarding the histological subtype two cases presented nodular forms of melanoma and two acral lentiginous melanomas.

Patients with mucosal melanomas were over 60 years old. The dermatoscopic structures observed were: the presence of blue/red colours, irregular diffuse pigmentation, blue-white veil, the presence of regression, sudden interruption of the pigment at the edge of the lesion, structureless areas, milky red areas, Crisalys.

Conclusions: Acral melanomas with a lower Breslow index in our study showed an association with dermatoscopic models such as pigmented PRP, atypical PFP (parallel fibrillar pattern) and focal pigment peripheral areas. Polymorphous vessels, milky red areas and ulceration were the hallmarks of thicker acral melanomas. Vascular PRP, although identified as a new type of dermatoscopic model associated with acral melanomas, could not be associated with thin or thick acral melanomas, being more a descriptive feature than one of statistical significance for acral melanomas in this study.

Study3.Dermatoscopic, ultrasonographic and immunohistochemical correlations in acral melanomas

Introduction and objectives: Increased tumour growth and vascularity along with histological factors (tumour thickness or Breslow index, Clark level of invasion or mitotic rate) have been shown to play an important role in predicting the risk of metastasis in melanoma. Doppler ultrasonography, along with dermatoscopy and clinical examination, increases diagnostic accuracy and improves melanoma management.

The aim of this study was to correlate certain dermatoscopic structures observed in acral melanomas with ultrasonographic changes in tumour vascularization and certain immunohistochemical parameters that evaluated angiogenesis and lymphangiogenesis.

Patients and method: The present study was observational, analytical, prospective, transversal and cohort. The study included 10 patients diagnosed with primary acral melanoma, admitted within the Dermatology Department of the Cluj-Napoca Emergency Clinical Hospital between January 2014 and November 2016 for diagnosis and treatment. The study had the approval of the Ethics Committee of the University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca no. 170 / 12.05.2014. Prior to inclusion in the study, all patients signed an informed consent.

The dermoscopic structures analysed were pigmentary PRP at the level of the lesion or only in the periphery, irregular diffuse pigmentation, vascular structures (polymorphous vascular pattern, milky red areas/globules, irregular linear vessels, corkscrew vessels). Each tumour lesion was evaluated by high-frequency (US) ultrasonography prior to surgical excision using an 8-40 linear transducer in the longitudinal and transverse planes without compressing the lesion to alter blood flow. The appearance of vascularization was assessed and the number of vascular pedicles present in the lesion was recorded for each tumour. Qualitative real time elastography was used to assess tumour elasticity in relation to normal peritumoral tissue. All patients underwent surgical excision with histopathological and immunohistochemical evaluation of the tumour lesions and all were treated according to the staging proposed by AJCC Melanoma Staging and Classification 2009. Antibodies for VEGFR-2 1:50 (polyclonal, Abcam) and CD34 1: 100 (Qbend 10, Immunological) vascular markers were used to detect tumoral and peritumoral vascular structures - MVD (microscopic vascular density) – and (Qbend 10, Immunological) was used D2-40 1:25 (Abcam) for LVD (lymphatic vessel density).

To evaluate tumour proliferation, immunohistochemical staining was performed to detect Cyclin D1 using Cyclin D1 1:40 (P2D11F11, Novocastra) and ki67 1: 600 (MYB1, Immunological) antibodies. All immunohistochemical staining was performed automatically using Ventana, Roche Bench Mark Ultra, HIER CC1 with optical detection kit and red ultra-view. The analysis and quantification of immunohistochemical slides were performed using the Olympus BX43 microscope.

Results: The median age of the patients was 62 years. 40% of patients were males and 60% were female patients. The median of the Breslow index was 4.25 mm. Dermoscopic evaluation of the tumours revealed that the majority of tumours, eight (80%) presented a polymorphous vascular pattern, with milky red areas/globules being the most prominent vascular structure. 20% of acral melanomas did not show or showed very few visible vessels. The pigment component was more prominent in these tumours. On high-frequency ultrasound examination, all melanomas looked hypoechoic. 60% had a homogeneous appearance and 40% were inhomogeneous. In 20% of melanomas, the presence of vascular structures was not detected, as they were soft on real-time elastography examination, and 80% of melanomas showed more than two vascular pedicles, having a rigid, hard appearance on real-time elastographic examination. Melanomas that showed a polymorphous vascular pattern which included milky red areas/globules were associated with ultrasonographically hypervascularized tumours. There was a statistically significant correlation ($p = 0.02$) between the presence of milky red areas / globules and hypervascularized tumours with more than two pedicles on Doppler examination. These tumours also had a rigid appearance on real-time elastography, with a statistically significant association ($p = 0.02$). The average thickness of the tumours on ultrasonographic examination was 4.5 mm, in accordance with the average Breslow index measured histopathologically. Immunohistochemical analysis of histological slides did not show a correlation between intratumoral or peritumoral MVD and the presence of ultrasonographic or dermoscopic vessels. MVD did not influence the elastography appearance of the tumours in real-time elastography examination. The median LVD determination on immunohistochemical analysis was 1.87 intratumoral and 3.5 peritumoral. The absence of the polymorphous vascular pattern on dermoscopic examination, which included milky red areas / globules, was correlated ($p = 0.05$) with the absence or presence of very few intratumoral LVDs and an increased density of peritumoral LVDs. The polymorphous vascular pattern including milky red areas / globules observed on dermoscopic examination was associated with hypervascularized tumours on ultrasonographic examination, hard, rigid tumours on real-time elastographic examination, and increased intratumor LVD density on immunohistochemical

evaluation. Hypervascularized tumours with many vascular pedicles on ultrasound examination correlated with intratumoral lymphatic vessel density.

Conclusions: Our study, although performed on a small number of patients, showed that the presence of dermatoscopic structures such as milky red areas / globules and the polymorphous vascular pattern in acral melanomas is associated with tumour hypervascularization on ultrasonographic examination, with tumour stiffness on real-time elastography and also with increased intratumoral lymphatic vessel density and a tendency of these melanomas to express Cyclin D1.

Study 4. Genetic changes in primary acral melanomas and acral melanocytic nevus versus primary melanomas and melanocytic nevus developed on sun-exposed areas - an NGS Ion Torrent pilot comparative study

Introduction și objectives: In the spectrum of melanomas, acral melanoma is clinically, histologically and molecularly a unique tumour. Unlike cutaneous melanomas, the aetiology of acral melanomas does not involve exposure to UV radiation, these tumours have a low number of point mutations and a high frequency of altered copy number. Acral melanomas have a different mutational profile than cutaneous melanomas. The mutagenesis pathways described in melanoma are multiple, the occurrence of melanoma being a more complex process of interactions between these pathways to which are added environmental factors and patient-related factors. No major mutagenic driver has been found in acral melanomas, such as UV radiation in melanomas on sun-exposed areas. Trauma or physical tension have been proposed as factors involved in the etiopathogenesis of acral melanomas, but a clear association has not been demonstrated. Although the appearance of acral melanomas on acral melanocytic nevus is an unusual occurrence, the presence of multiple acral melanocytic nevus has been identified as a risk factor in the occurrence of acral melanomas.

The present study aims to perform, using new methods of next-generation sequencing, a comparative mutational analysis of acral melanomas compared to acral nevi, cutaneous melanomas and nevi located on sun-exposed areas.

Patients and method: Patient selection and data collection: 16 patients diagnosed and treated in the Cluj-Napoca Dermatology Clinic were randomly included in the study, depending on the order of presentation and acceptance of participation in the study. Of these, 4 patients were diagnosed with acral melanoma MMA, 4 patients diagnosed with acral nevus NA, 4 patients diagnosed with melanoma developed on skin with intermittent sun exposure (trunk) MMT and 4 patients with nevi on the NT trunk. These patients presented in the clinic between January 2016 and December 2018. All patients were Romanian, Caucasian, over 18 years old and signed an informed consent. Clinical and demographic data, histopathological data and genetic data obtained by NGS sequencing were recorded for each patient using Ion Torrent "Personal Genome Machine", Life Technologies 2011. DNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissues (FFPE) using Invitrogen's PureLink™ Genomic DNA Mini Kit.

DNA quantification: The amount of DNA obtained during the extraction and purification protocol was quantified with the NanoDrop-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). **Amplicon library preparation:** For each sample, the amplicon library was prepared strictly following the manufacturer's protocol, using a series of Ion AmpliSeq Kits from Applied Bioscience. **Amplification of genomic DNA with specific primers:** The amplification of genomic DNA was performed using the "Ion AmpliSeq Cancer Panel" kit from Applied Bioscience, which contains primers for 50 genes that are known to present mutations related to cancer (*ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNA1, EGFR, ERBB2, ERBB4, EZH2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAS, GNAQ, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KDR,*

KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53, and VHL). **Partial digestion of primers:** In order to continue with the library synthesis, the primers used to amplify the targeted genes must be removed. **Barcode ligation:** After digesting the primers, the barcodes and adapters that allow multiplex sequencing with the Ion Torrent tool are added. **Amplicon purification:** The purification step is necessary to remove the remaining genomic DNA and unattached primers, and to ensure the high quality of the amplicons required for the subsequent steps of the sequencing protocol. **Library purification:** The purification step is necessary to remove the remaining genomic DNA and unattached primers and to ensure the high quality of the amplicons required for the subsequent steps of the sequencing protocol. **Library quantification:** Library quantification was performed using the Qubit 2.0 fluorometer and the Qubit dsDNA HS kit. **Matrices synthesis:** Four different libraries diluted to 100 pM were used for the synthesis of sequencing matrices. **ISP enrichment** and ISP loading to the sequencing chip.

Results: 171 missense mutations, 10 nonsense mutations, 1 deletion-type mutation with a change in reading frame and one deletion-type mutation without a change in reading frame were identified. Out of 74 pathogenic mutations, 21 bear the signature of UV radiation (1 MMA mutation, 11 NA mutations, 6 MMT mutations and 3 NT mutations). Most common mutated genes (20 genes) were in the NA / NT group. The NA group contains most mutated genes, followed by the NT group. ATM, RB1, IDH2 and TP53 are among the most frequently mutated genes in the NA group. Within the MMA group, the genes with a higher number of mutations were ABL1 and KIT, and genes with more than one mutation are APC, FLT3 and RB1.

Characteristics of mutated genes:

KIT gene- 17 mutations were identified, the most pathogenic mutations were located in exons 10,11,17 and one in exon 13, with distribution in all study groups.

RB1 gene- the first tumour suppressor gene identified to be involved in melanoma via the CDK4 / CDKN2A pathway, along with p53. 15 RB1 somatic mutations were identified in the study: 2 in the MMA group uncharacterized and eight, of which 3 were pathogenic, in the NA group.

IDH1 gene- reported in the triple wild-type negative melanoma. IDH1 gene presented in the study 3 pathogenic mutations in the MMA, NA, NT groups. This gene defines a special category of patients with melanoma who can respond to IDH1 targeted therapies or IDH1 / MEK combination therapies when mutations in this gene coexist with NRAS mutations.

ABL1 gene - is involved in the processes of cell differentiation and division, tumour progression and metastasis. The study identified 6 somatic mutations, 4 in the MMA group, of which 2 pathogenic mutations.

FLT3 gene- promotes the activation of the RAS signalling pathway, cell proliferation and resistance to apoptosis. The study identified 9 somatic mutations, two of which were in MMA group.

PTPN11 gene- has a role in tumorigenesis by activating the RAS / RAF / MAPK pathway and regulates β -catenin and Cyclin D1. It can be a therapeutic target in BRAF wild-type melanomas. The study identified 5 somatic mutations in MMA and NA groups, of which 3 were pathogenic.

FGFR2 gene- influences mitogenesis and cell differentiation, as well as the processes of neoangiogenesis. In melanomas treated with BRAF / MEK inhibitors, when this pathway is blocked, FGF / FGFR signalling may be one of the mechanisms leading to the development of resistance to BRAF / MEK treatment. In our study, 3 somatic mutations were detected in the MMA, NA groups; of which 2 were pathogenic.

Conclusions: Many critical knowledge gaps remain in the tumor genetics of melanoma, so a comprehensive molecular characterization of the various subtypes of melanoma, including acral melanoma and benign melanocyte lesions, is needed for a better understanding of gene interaction and clarification of the molecular events that underlie the aggressive behavior of some of them.

General conclusions

1. The evaluation of the frequency of acral and mucosal melanomas and the histopathological characteristics of these subtypes of melanoma identified several prognostic factors associated and reported in the literature as having a negative role, such as: age, acral and mucosal location, a higher Breslow index, the presence of lymphovascular invasion and a reduced inflammatory infiltrate within and around the tumour.

2. The defining dermatoscopic structures for acral and mucosal melanomas showed a statistically significant association with the Breslow index (melanoma thickness). Dermatoscopic models such as pigmented PRP, atypical PFP (parallel fibrillar pattern), and focal pigmented peripheral areas were associated with a lower Breslow index being characteristic of thin acral melanomas; polymorphous vessels, milky red areas, and ulceration were characteristic of higher Breslow index, thick melanomas.

3. Certain dermatoscopic structures observed in acral melanomas have been correlated with ultrasonographic changes in tumour vascularization and certain immunohistochemical parameters that evaluated angiogenesis and lymphangiogenesis. Our study showed that the presence of dermatoscopic structures like milky red areas/globules and the polymorphous vascular pattern in acral melanomas is associated with tumour hypervascularization on ultrasonographic examination, tumour stiffness on real-time elastography, an increased intratumoral lymphatic vessel density and a tendency of these melanomas to express Cyclin D1. The results of this study will need to be validated on larger groups of patients.

4. The genetic study identified and highlighted certain genes characteristic of a particular subtype of melanoma (triple wide subtype), strengthened the data in the literature on the number of somatic mutations reported in acral melanomas versus other forms of melanoma. Tumour genetics of melanoma is very complex, but many critical knowledge gaps remain. The results of our study shall need to be validated on larger patient groups.

Originality and innovative contributions of the thesis

In this paper we tried a complex assessment of rare subtypes of melanoma, represented by acral and mucosal melanomas, melanomas associated with a worse prognosis than other subtypes. The only way to improve their prognosis is to identify them early, preferably by non-invasive methods, given their particular location in difficult anatomical areas.