

UNIVERSITATEA OVIDIUS DIN CONSTANȚA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ
DOMENIUL MEDICINĂ
ANUL UNIVERSITAR 2024/2025

TEZĂ DE DOCTORAT

**Corelații clinice, morfologice și
imunofenotipice în melanomul
cutaneo-mucos cu status mutațional
CDKN2A**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător de doctorat: **Prof. Univ. Dr. Mariana Așchie**
Coducător de doctorat în cotutelă: **Prof. Univ. Dr. Ana-Maria Forsea**

Doctorand: **Luana-Andreea Boșoteanu (Nurla)**

CUPRINS

ABREVIERI UTILIZATE ÎN TEXT.....	11
PARTEA GENERALĂ. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	15
Capitolul 1. Melanomul. Considerații generale.....	16
1.1. Noțiuni de epidemiologie.....	16
1.2. Factori de risc.....	17
1.3. Clasificarea clinică și histopatologică a melanomului.....	19
1.4. Stadializarea melanomului.....	23
1.5. Factori prognostici.....	28
1.6. Management-ul pacienților cu melanom.....	29
1.7. Follow-up, implicații pe termen lung și supraviețuire.....	31
Capitolul 2. Concepte și modalități actuale de investigare a melanomului.....	33
2.1. Protocolul clinico-dermatoscopic pentru diagnosticul melanomului cutanat.....	33
2.2. Aspecte histopatologice în melanomul cutaneo-mucos.....	38
2.3. Caracterizarea melanomului prin tehnici de biologie moleculară și secvențiere genomică.....	43
PARTEA SPECIALĂ. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....	54
1. Ipoteze generale de lucru și motivația studiului.....	55
2. Obiective generale.....	56
Capitolul 3. Direcția de cercetare 1. Melanoamele cutaneo-mucoase: Caracterizare epidemiologică, clinică, dermatoscopică și histopatologică a pacienților cu melanom familial/primar multiplu versus melanom sporadic.....	58
Metodologie generală.....	58
3.1. Studiul 1.1. Caracterizare epidemiologică, clinică și histopatologică a pacienților cu melanom cutaneo-mucos.....	59
3.1.1. Introducere.....	59
3.1.2. Ipoteză de lucru și obiective.....	60
3.1.3. Material și metodă.....	60
3.1.3.1. Tehnici de lucru histopatologice.....	62
3.1.4. Rezultate.....	69

3.1.4.1. Caz particular identificat în cadrul lotului evaluat.....	84
3.2. Studiul 1.2. Caracterizare clinică și dermoscopică a leziunilor melanocitare prezente la pacienții cu melanom familial și/sau melanom primar multiplu.....	92
3.2.1. Introducere.....	92
3.2.2. Ipoteză de lucru și obiective.....	93
3.2.3. Material și metodă.....	93
3.2.4. Rezultate.....	97
3.2.4.1. Cazuri particulare evidențiate în studiul 1.2.	103
3.3. Discuții parțiale ale studiului 1.....	108
3.4. Concluzii parțiale ale studiului 1.....	111
Capitolul 4. Direcția de cercetare 2. Examinarea imunohistochimică și investigarea statusului mutațional CDKN2A în lotul de pacienți cu melanom cutaneo-mucos familial și melanom primar multiplu.....	113
Metodologie generală.	113
Ipoteză de lucru și obiective generale.	113
4.1. Studiul 2.1. Evaluarea profilului imunohistochimic p14 și p16 al pacienților cu melanom familial și/sau primar multiplu.....	114
4.1.1. Introducere.....	114
4.1.2. Material și metodă.....	115
4.1.3. Rezultate parțiale ale studiului 2.1.	119
4.1.3.1. Caracteristici demografice, clinice și histopatologice ale lotului analizat.....	120
4.1.3.2. Rezultate ale profilului imunohistochimic p14 și p16.....	122
4.2. Studiul 2.2. Detecția profilului mutațional CDKN2A prin tehnica de hibridizare fluorescentă in situ (FISH)	125
4.2.1. Introducere.....	125
4.2.2. Material și metodă.....	126
4.2.3. Rezultate parțiale ale studiului 2.2.	127
4.3. Rezultatele globale ale studiului 2.	128
4.4. Discuții parțiale ale studiului 2.....	129
4.5. Concluzii parțiale ale studiului 2.	132

Capitolul 5. Direcția de cercetare 3. Evaluarea imunoreacției CD8 prin tehnica manuală versus prin intermediul inteligenței artificiale.....	133
5.1. Introducere.....	133
5.2. Ipoteză de lucru și obiective.....	134
5.3. Material și metodă.....	134
5.4. Rezultate.....	137
5.4.1. Descoperiri imunohistochimice CD8 în infiltratul peritumoral.....	138
5.4.2. Diferențele dintre expresia imunohistochimică a CD8 în infiltratul peritumoral analizat de către examinatori umani versus prin platforma de IA.....	139
5.5. Discuții parțiale ale studiului 3.....	141
5.6. Concluzii parțiale ale studiului 3.....	145
Capitolul 6. Direcția de cercetare 4. Mijloacele de informare digitale și aportul asupra prevenției și diagnosticului precoce de melanom.....	147
Rolul educației în social media asupra prevenției melanomului: Analiză bazată pe chestionar în rândul utilizatorilor digitali din România (ROUTE)	147
6.1. Introducere.....	147
6.2. Ipoteză de lucru și obiective.	147
6.3. Material și metodă.....	148
6.3.1. Design-ul studiului.....	148
6.3.2. Procesul de selecție a participanților.....	153
6.4. Rezultate.....	154
6.5. Discuții parțiale ale studiului 4.....	160
6.6. Concluzii parțiale ale studiului 4.....	163
Capitolul 7. Direcția de cercetare 5. Crearea unui algoritm de monitorizare imunofenotipică personalizată a pacienților cu melanom familial și melanom primar multiplu, cu status mutațional CDKN2A variabil.....	165
7.1. Introducere.....	165
7.2. Ipoteză de lucru și obiective.....	167
7.3. Material și metodă.....	167
7.3.1. Analiza histopatologică a specimenelor și caracterizarea clinico-epidemiologică a lotului de studiu.....	167

7.3.2. Analiza imunohistochimică.....	170
7.3.3. Analiza genetică prin tehnica FISH.....	171
7.3.4. Analiza statistică.....	171
7.4. Rezultate.....	172
7.4.1. Evaluarea individuală p16, CD8 și Ki-67.....	172
7.4.2. Evaluarea corelațiilor clinice și genetice generale ale cazurilor incluse.....	174
7.4.3. Algoritmul triplu de scorificare p16-CD8-Ki-67 pentru diferențierea melanoamelor familiale/primare multiple CDKN2A-wt și CDKN2A-mutante.....	176
7.4.4. Cazuri particulare identificate în cadrul analizei.....	179
7.5. Discuții parțiale ale studiului 5.....	181
7.6. Concluzii parțiale ale studiului 5.....	187
8. Concluzii generale (sinteză)	189
9. Originalitatea tezei.....	193
REFERINȚE.....	194
ANEXE.....	233
LISTA DE PUBLICAȚII.....	238
LISTA DE FIGURI.....	337
LISTA DE TABELE.....	342

Cuvinte-cheie: Melanom cutaneo-mucos, Melanom familial (MF), Melanom primar multiplu (MPM), Mutație CDKN2A, p14, p16, CD8, Ki-67, FISH, Inteligență artificială

Teza de doctorat cuprinde:

- 343 de pagini, dintre care 53 constituie Partea Generală
- 49 de figuri, dintre care 8 în Partea Generală
- 29 de tabele, dintre care 4 în Partea Generală
- 287 de referințe bibliografice

Notă: în rezumatul de față, cuprinsul a fost păstrat sub aceeași formă ca în teza de doctorat.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Melanomul. Considerații generale

Melanomul este o formă de malignitate ce derivă din melanocite, celule specializate în sinteza și eliberarea de pigment melanic, localizate cutanat, uveal și în epiteliul mucos. Melanomul cutanat (MC) reprezintă cel mai frecvent tip și comportă diferiți factori de risc, prognostici și predictivi în comparație cu melanomul originat din alte categorii tisulare [1]. Din punct de vedere epidemiologic, incidența pe sexe variază: 16.8/100000 femei, respectiv 27.4/100000 bărbați, dar datele privitoare la mortalitate nu respectă același raport: 1.6/100000 la populația de sex feminin, în contrast cu 3.9/100000 la populația de sex masculin [2].

CDNK2A reprezintă o genă de susceptibilitate investigată mai ales în cazurile de melanom familial; nu au fost identificate review-uri sistematice și meta-analize disponibile la momentul actual; unele studii au examinat potențialele asocieri între gen și mutațiile germinale ale acestei gene, au luat în considerare penetranța genetică și caracteristicile clinico-patologice ale cazurilor de melanom diagnosticate la purtători, însă descoperirile au fost concordante într-o proporție semnificativă spre absența oricărei relații dovedite.

Radiațiile ultraviolete (UV) captate de tegument în urma expunerii la soare și la aparatele de bronzaj artificial sunt asociate în mod clar și definitiv cu dezvoltarea melanomului, conform International Agency for Cancer Research (Agenția Internațională pentru Cercetarea Cancerului). Au fost descrise variate modele de expunere solară, tipul major fiind reprezentat de cea intermitentă, practică la sfârșit de săptămână de persoanele care lucrează în interior, conducând, în general, la arsuri cutanate. Meta-analizele disponibile până în acest moment arată faptul că expunerea cronică, persistentă la soare (de exemplu, recepționarea radiațiilor solare cu frecvență zilnică și tipar ocupațional) nu crește riscul de apariție a melanomului [3].

Consumul regulat de cafea, prin valoarea antioxidantă pe care o implică polifenolii constituenți, a demonstrat un risc mai mic cu 38% la femei în comparație cu populația masculină (unde nu a fost înregistrată nicio diferență semnificativă statistic) și cu grupul de persoane de sex feminin care prezintă un aport ocazional sau nul de cafea [4].

Sintetic, formele majore de prezentare clinică sunt, conform lui Fitzpatrick *et al.*: melanomul *in situ*, melanomul dezvoltat pe lentigo malign, melanomul extensiv în suprafață, melanomul nodular, melanomul desmoplazic, melanomul lentiginos acral, melanomul amelanotic, melanomul mucoaselor și forma particulară de melanom metastatic [5].

Măsurătorile pentru stabilirea grosimii tumorale sunt efectuate actualmente conform ultimei ediții publicate de Comitetul Unit American pentru Cancer (AJCC, *American Joint Committee on Cancer*) [6]. Ganglionii loco-regionali ce conțin metastaze sunt clasificați, în funcție de număr, în cadrul indicatorului “N”. Descriptorii anteriori, definiți empiric “microscopici” sau “macroscopici”, au fost supuși unei noi nomenclaturi – “clinic ocuți” (de exemplu, stadiul clinic I-II cu metastaze ganglionare identificate în cadrul biopsiei ganglionului santinelă), respectiv de boală nodală regională “clinic aparentă” (de exemplu, în stadiul clinic III). Volumul lezional prezent în ganglionul santinelă, identificat în urma biopsiei nodale (SLNB, *sentinel lymph node biopsy*), este considerat factor prognostic pentru boala regională, ce trebuie stabilit pentru fiecare pacient cu rezultat pozitiv, însă nu se utilizează pentru a decide grupul categoriei N. Termenul de “microsatelit” se referă la metastazele microscopice cutanate sau subcutanate, adiacente sau subiacente tumorii primare; celulele microsatelitare nu se află în raport de contiguitate cu cele

originare în melanomul primar; interpunerea inflamației dermice, a fibrozei sau a țesutului cicatriceal sunt absente. Metastaza “satelit” definește metastaza intralimfatică evidențiată la o distanță de maxim 2 cm în raport cu melanomul primar. Metastaza în-tranzit se remarcă, în contrast, la mai mult de 2 cm față de situsul primar, dar nu distal față de ganglionii limfatici regionali [7].

În ceea ce privește stadializarea melanomului, definițiile stadiilor IA și IB au fost revizuite; o altă modificare constă în faptul că stadiul IV nu mai este subdivizat consecutiv (de exemplu, M1c semnifică stadiul IV, nu stadiul IV C, ca în trecut). Este necesar a fi menționat faptul că definirea ganglionilor drept “clinic detectabili” se efectuează atunci când pot fi obiectivați prin palpăre la examenul clinic și pot fi certificați ca metastaze loco-regionale ale unui melanom la examenul histopatologic ce succede excizia sau biopsia. De asemenea, stadializarea clinică trebuie utilizată convențional după excizia completă a tumorii primare, asociată cu evaluarea completă clinică a metastazelor regionale și la distanță [8].

Indicele Breslow, ce se referă la grosimea tumorală, măsurată – cu ajutorul unui micrometru ocular calibrat – din zona cea mai superficială (*stratum granulosum* epidermic) până în porțiunea cea mai profundă a populației melanocitare maligne, reprezintă cel mai important factor de prognostic în melanom, în sensul în care o valoare mai mare se corelează cu un risc crescut de metastazare [9]. Alți markeri prognostici și predictivi negativi includ: valorile mult crescute ale lactat-dehidrogenazei serice [10], numărul mare de mitoze pe mm² (element histologic), nivelul de invazie Clark avansat și dispunerea anatomică (formele localizate la nivel cervico-cefalic sunt recunoscute pentru agresivitatea deosebită).

Abordarea terapeutică a melanomului variază în funcție de gradul de extensie a bolii, astfel încât excizia locală largă a tumorii primare, cu margini de siguranță personalizate în funcție de valoarea indicelui Breslow este suficientă în cazurile de boală locală. Biopsia ganglionului sentinela este recomandată pentru toți pacienții cu minim pT1b, conform sistemului de stadializare TNM enunțat de ultima ediție a AJCC, iar disecția ganglionară completă (CLND, *complete lymph node dissection*) este indicată în caz de metastaze ganglionare loco-regionale clinic detectabile izolate (macroscopic, non-ganglion sentinela). În continuare, pacienții cu melanom rezecat stadiul III trebuie evaluați pentru terapie adjuvantă, în cadrul căreia agenții anti-PD1, Nivolumab, Pembrolizumab, sau Dabrafenib/Trametinib constituie opțiunea preferată. Pacienții cu melanom metastatic trebuie să fie evaluați pentru detecția mutației BRAF V600 (specimen obținut din tumora primară sau – preferabil – din metastaza evidențiată), deoarece agenților precum cei antemenționați li se adaugă posibilitatea utilizării unei combinații BRAFi (inhibitor BRAF, *BRAF inhibitor*)/MEKi (inhibitor MEK, *MEK inhibitor*), în cazul în care melanomul investigat prezintă pozitivitate BRAF.

În contextul în care 8% dintre pacienții cu melanom dezvoltă al doilea melanom primar în decursul primilor 2 ani de la diagnosticul inițial [11], pe parcursul urmăririi post-terapeutice, pacienții sunt monitorizați clinic cu scopul de a identifica precoce potențiale recidive sau alte tumori cutanate, în special noi melanoame primare [12]. În mod curent, nu există un consens în ceea ce privește frecvența consulturilor post-tratament și a utilizării tehnicilor imagistice și biologice de laborator în grupul pacienților cu melanom excizat, iar – totodată – intervalele dintre vizitele clinice și examenele imagistice pot fi personalizate în funcție de riscul individual și de necesitățile personale ale pacientului [13].

2. Concepte și modalități actuale de investigare a melanomului

Leziunile pigmentare suspecte sunt, de obicei, analizate clinic urmărind semnul “rățușca cea urâtă” (*ugly duckling*), ce semnifică obiectivarea macroscopică a unui nev melanocitar de dimensiuni mari în cadrul unei serii de nevi cu dimensiuni scăzute sau a unui nev unic hipocrom observat printre multipli nevi de culoare închisă. În fond, acest element semiologic este descris în urma unei evaluări comparative a aspectului macroscopic al tuturor leziunilor pigmentare ale pacientului, în cazul în care acesta prezintă un nev cu caracteristici clinice diverse față de ceilalți [14]. Adicional, algoritmul “ABCDE” constituie un instrument de evaluare clinică a morfologiei leziunilor pigmentare și reprezintă acronimul pentru: asimetrie, margini neregulate (*borders*), culoare neuniformă, diametru mai mare de 6 mm și evoluție radială, de extindere în suprafață, urmată de etapa de creștere verticală [15].

Deși aceste criterii pentru examinarea cutanată “cu ochiul liber” au ameliorat ratele de identificare a melanomului extensiv în suprafață și a melanomului nodular, multiple alte subtipuri clinice au rămas nediagnosticate, astfel încât s-a impus exploatarea și rafinarea metodelor tehnologice, prin introducerea dispozitivului portabil numit dermatoscop, ce asigură magnificare de 10x, asociată cu iluminarea tegumentului, în asemenea manieră încât minimizează reflexia luminoasă de la nivelul pielii și facilitează vizualizarea cromatică și structurală a planurilor subiacente *stratum corneum*, nedecelabile cu ochiul liber [16]. În manieră sumară, criteriile dermatoscopice care pledează pentru diagnosticul de melanom cuprind: rețeaua pigmentară atipică [17], liniile angulare [18], rețeaua negativă [19], punctele și globulele atipice [20,21], voalul alb-albastru [22], petele atipice [23], structurile regresive [24], desenul vascular atipic [25] și striurile neregulate [26].

Descrierea histopatologică include leziuni asimetrice și slab circumscrise, cu alterări citoarhitecturale și, de obicei, atipie celulară marcată. Elementele specifice integrează consumpție epidermică, distribuție pagetoidă a melanocitelor, în cuiburi, cu polimorfism dimensional și de formă (care pot fi confluențe sau fără maturăție), melanocite în spațiile limfovaskulare, mitoze profunde și atipice, asociate proceselor apoptotice intense. În cazul în care se remarcă ulcerăție, aceasta constituie un factor prognostic nefast. Principalele celule identificate pot fi clasificate în două tipuri majore: celule epitelioide și fusiforme. Primele reprezintă celule rotunde, de dimensiuni mari, cu citoplasmă eozinofilă abundentă, nucleu veziculos și proeminenți și nucleoli evidenți. Cel mai frecvent, acestea apar în contextul melanoamelor cu extensie în suprafață și al formelor nodulare. Celulele fusiforme prezintă o capacitate mai mare de coeziune celulară, în comparație cu grupul celor epitelioide. De asemenea, se descriu nucleu de dimensiuni mai mici, ovalari, cu pleomorfism ușor-moderat, ce înglobează nucleoli mici, dificil de evidențiat. Rareori, se identifică atipie nucleară marcată, cu prezența asociată a celulelor tumorale gigante [27].

Diagnosticul diferențial histopatologic, în absența clinică a pigmentării lezionale, trebuie efectuat cu alte entități ce asociază microscopic celule fusiforme, precum leiomiomul, carcinomul spinocelular cu celule fusiforme, fibroxantomul atipic și dermatofibrosarcomul protuberans; în aceste eventualități, colorațiile speciale și tehnicile imunohistochimice sunt utile pentru a evalua originea melanocitară a celulelor tumorale. Leziunile neoplazice amelanotice pot fi confundate, în plus, cu histiocitoza Langerhans, carcinomul sau limfomul anaplastic [28].

Testările de biologie moleculară ce ținesc mutațiile acționabile sunt obligatorii în cazul pacienților cu stadiul III sau IV de melanom la diagnostic, rezecabil sau non-rezecabil, și au grad înalt de recomandare pentru stadiul IIC, asociat cu rezecția tumorii primare și risc crescut, astfel

Încât testarea moleculară BRAF reprezintă o investigație ineluctabilă [29]. În plus, s-a observat că aproximativ 10% dintre pacienții cu melanom cutanat prezintă istoric familial pozitiv pentru această malignitate, iar mutația CDKN2A reprezintă cea mai frecventă cauză a melanomului familial. Purtătorii de mutații genetice comportă un risc întins pe toată perioada vieții de dezvoltare a melanomului, de aproximativ 70%, cu vârstă scăzută de incidență [30]. Având în vedere incertitudinea direcției și gradului de implicare a mutației CDKN2A (CDKN2A-mut) în evoluția și supraviețuirea purtătorilor săi, Ipenburg *et al.* au notat că pacienții CDKN2A-mut dezvoltă mai frecvent melanoame primare multiple și că media vârstei la diagnostic este cu 15 ani mai joasă pentru această categorie de pacienți, față de cei cu melanom sporadic [31], iar mutația CDKN2A a fost asociată cu leziuni melanocitare maligne mai subțiri, cu indice Breslow mediu de 0.6 mm (comparativ cu 0.9 mm) [32].

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteze generale de lucru și motivația studiului

Studiile recente de biologie moleculară au indicat rolul particular al mutațiilor de la nivelul genei CDKN2A în patologia melanomului cutaneo-mucos, acestea caracterizând cazurile diagnosticate în rândul a minim doi membri ai aceleiași familii, precum și tabloul genetic al indivizilor cu multiple melanoame primare. Întrucât povara financiară asociată investigării exhaustive a cazurilor de melanom devine clară în momentul implementării protocoalelor standard de examinare și personalizare a procesului diagnostic și terapeutic, este necesară clarificarea potențialului prognostic și valorii diagnostice a unor markeri imunohistochimici auxiliari, ce să funcționeze ca tehnici-surogat sau adiționale, utile în caracterizarea complexă a acestei entități nosologice. Suplimentar, posibilele corelații între parametri studiați vor influența detectarea precoce, cu impact direct asupra prognosticului, prin creșterea speranței de viață și a calității vieții pacienților din această categorie.

2. Obiective generale

Lucrarea de față își propune investigarea dermatoscopică, histopatologică, imunohistochimică și genetică a variatelor forme clinice de prezentare a melanoamelor cutaneo-mucoase, examinând prezența celor mai elocvente corelații între parametri imunohistochimici (p14, p16, CD8, Ki-67) și statusul mutațional CDKN2A investigat prin tehnici de biologie moleculară, precum și rolul prognostic și valența cunoașterii lor. Sub umbrela limitelor corelațiilor extrase – teza are ca scop elaborarea unui algoritm personalizat, bazat pe indicatori imunohistochimici cu rol testat în cadrul clinic și evolutiv, util medicilor anatomo-patologi și dermatologi, în vederea efectuării mai facile a diagnosticului diferențial dintre tumorile melanocitare maligne asociate unei mutații CDKN2A și cele de tip sălbatic, ce nu prezintă această alterare genică.

De asemenea, integrarea temei din sfera dermato-oncologică în contextul actual al progresiei tehnologice este demonstrată și în cercetarea ce a explorat potențialul platformei bazate pe inteligență artificială (QuPath) de a cuantifica pozitivitatea infiltratului limfocitar intra- și peritumoral pentru colorația CD8, precum și în studiul ce a investigat rolul rețelelor sociale în promovarea bunelor practici de helioprotecție și profilaxie a daunelor determinate de radiațiile ultraviolete.

3. Direcția de cercetare 1. Melanoamele cutaneo-mucoase: Caracterizare epidemiologică, clinică, dermatoscopică și histopatologică a pacienților cu melanom familial/primar multiplu versus melanom sporadic

În prima parte a cercetării, am evaluat trăsăturile epidemiologice, clinice, histopatologice și dermatoscopice ale cazurilor de melanom cutaneo-mucos selecționate din cadrul celor două centre de referință în care a fost elaborată lucrarea. Prin intermediul observațiilor notate, s-a urmărit definirea corelațiilor dintre variații parametri anteexpuși și caracteristicile clinice, histopatologice și dermatoscopice înregistrate cu cea mai crescută frecvență în rândul pacienților diagnosticați cu această afecțiune dermato-oncologică.

Studiul 1.1 a cuprins analiza indicatorilor demografici, epidemiologici, clinici și microscopici ai cazurilor. În acest sens, mi-am propus evaluarea unui lot de pacienți internați în regim de spitalizare sau prezentați în ambulator pentru suspiciunea sau diagnosticul confirmat de melanom cutaneo-mucos, în cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență "Sf. Apostol Andrei" Constanța și al Spitalului Universitar de Urgență "Elias" București. În urma analizei fișelor de evoluție clinică, a rapoartelor dermatoscopice și după urmărirea caracteristicilor histopatologice care au emis diagnosticul de certitudine de melanom cutaneo-mucos, cercetarea a fost completată, în manieră personalizată, de examenul imunohistochimic – prin utilizarea de paneluri individuale ce au integrat biomarkeri specifici, non-specfici și indicatori procentuali ai gradului de proliferare tumorală – precum și de tehnici de biologie moleculară, utile pentru precizarea statusului mutațional al entității patologice. Studiul cazurilor clinice din perioada ianuarie 2018 – decembrie 2022 a identificat un număr total de 169 de pacienți cu melanom cutaneo-mucos diagnosticat histopatologic și, eventual, confirmat imunohistochimic.

Profilul demografic al lotului de studiu a relevat preponderența cazurilor originare din județul Constanța, a melanoamelor dezvoltate pe situsuri tegumentare (95.26%), a cazurilor diagnosticate în anul 2018 (29.58%), a pacienților de sex masculin, provenind din mediul urban. Subtipul histopatologic principal a fost reprezentat de melanomul extensiv în suprafață (67.45%), valoarea medie a indicelui Breslow identificată a fost 3.65 mm, iar 41.42% dintre piesele operatorii evaluate microscopic au prezentat ulceratie. Ariile de regresie au fost evidențiate într-o minoritate din cazuri, invazia spațiilor limfo-vasculare a fost absentă în procent de 53.84%, iar absența invaziei perineurale a fost majoritară (76.33%). Raportat la rata mitotică per mm², numărul mediu a înregistrat o valoare de 1.35. Cea mai comună localizare a determinărilor secundare a fost organul cutanat, iar aproximativ o cincime dintre pacienți a fost diagnosticată în stadiul metastatic. În cadrul examenului dermatologic, asociat cu evaluarea dermatoscopică/videodermatoscopică, numărul mediu de leziuni pigmentare cuantificate în lotul de 169 de pacienți a fost egal cu 45 per pacient.

În *Studiul 1.2*, a fost efectuată evaluarea iconografică, prin intermediul FotoFinder, a profilului clinic și *pattern*-ului dermatoscopic caracteristic al nevilor prezenți la pacienți cu diagnostic histopatologic confirmat de MPM sau MF cutaneo-mucos. Informațiile obținute în urma examinării pacienților aflați în evidență cu diagnosticul de melanom cutaneo-mucos în cadrul Clinicii de Dermatologie a Spitalului Universitar de Urgență "Elias" din București au cuprins: datele epidemiologice și demografice (vârstă, sex, mediu de rezidență), clinice (topografia leziunilor melanocitare benigne și a melanoamelor primare, istoricul familial și/sau personal de melanom), histopatologice (subtip histopatologic, indice Breslow, prezența sau absența ulceratiei) și dermatoscopice (diametrul, regularitatea marginilor, simetria, cromatică lezională).

Lotul final de pacienți investigați a cuprins 10 pacienți cu MPM exclusiv, 4 pacienți cu MF exclusiv și 2 pacienți cu overlap de MPM și istoric familial de melanom la minim o rudă de gradul I. Prin intermediul sistemului de captare a imaginilor clinice pus la dispoziție de platforma de monitorizare FotoFinder (FotoFinder bodystudio ATBM master system, FotoFinder Systems GmbH, Bad Birnbach, Germania), au fost efectuate fotografiile corporeale totale ale pacienților examinați. Leziunile melanocitare identificate au fost selectate pentru monitorizare periodică ulterioară diagnosticului histopatologic de melanom, respectând următoarele criterii clinice: a) asimetrie, b) margini neregulate, imprecis delimitate, c) diametrul ≥ 6 mm, d) prezența ariilor eritematoase sau variabile maronii, e) identificarea simultană a componentelor maculare și papulare. Ulterior, imaginile de dermatoscopie corespunzătoare fiecărei leziuni pigmentare considerate semnificative au fost captate și analizate pentru definirea *pattern*-ului dermatoscopic global al fiecărui nev (reticular, globular, *starburst*, multi-component și atipic). Etapa secundară a inclus încadrarea leziunilor melanocitare ca benigne sau maligne, în funcție de criterii precum uniformitatea sau heterogenitatea structurilor de pe suprafața leziunii, regularitatea marginilor, modelul de pigmentare, simetria rețelei pigmentare, dimensiunea, regularitatea și distribuția globulelor maronii, localizarea punctelor atipice în raport cu periferia lezională și prezența depigmentării neregulate și/sau periferice. Având în vedere elementele anteexpuse, leziunile cu margini regulate, atenuare centrifugă a rețelei pigmentare spre periferie, fără pseudopode sau dispunere radială a globulelor au fost considerate nevi melanocitari benigni, în timp ce maculele sau papulele melanocitare cu contur neregulat, rețea pigmentară întreruptă brusc la periferie, agregare periferică de globule maronii, cu sau fără pseudopode, au fost sugestive pentru suspiciunea clinică de nevi atipici.

Vârsta medie la diagnostic în sub-grupul de pacienți exclusiv cu MF a fost de 35.5 ani, iar valoarea vârstei medii în sub-lotul de pacienți cu MPM a fost superioară (52.58 de ani). În continuare, s-a remarcat predominanța pacienților de sex masculin, a indivizilor cu fototip Fitzpatrick II și a subtipului histopatologic de melanom extensiv în suprafață. Majoritatea leziunilor maligne au fost diagnosticate la nivel trunchal, iar valoarea medie a indicelui Breslow calculat microscopic pentru fiecare prim melanom primar a fost de 2.37 mm în subgrupul de MPM și de 0.71 mm în sub-lotul de pacienți cu MF. Referitor la pacienții cu MPM, durata medie cuprinsă între momentul diagnosticului primului și celui de-al doilea melanom primar a fost de 33.33 de luni. Numărul total de nevi monitorizați prin intermediul platformei FotoFinder a fost de 890, cu o valoare medie de 53.33, respectiv de 62.5 de leziuni melanocitare per individ, în cadrul subiecților cu MPM, respectiv cu MF. Ulterior, au fost evaluate leziunile reprezentative înregistrate pentru fiecare pacient. Astfel, au fost analizați 158 de nevi cu caracteristici variate: 81 cu *pattern* reticular, 26 cu *pattern* globular, 41 cu model de prezentare multicomponent, 9 cu elemente dermatoscopice atipice și unul cu caracteristici de nev *starburst* (similar unei explozii stelare). 73.41% din leziuni au prezentat structuri omogene, iar 74.05% din totalul nevilor analizați au fost caracterizați de margini regulate. În ceea ce privește caracterul simetric al nevilor cu componentă reticulară, 67 dintre aceștia au indicat simetrie morfologică și cromatică a rețelei melanice (42.40%), iar 65 dintre ei (41.13%) au fost marcați de asimetrie, în timp ce 26 de leziuni nu au expus model reticular (16.45%). Depigmentarea a fost relevată în 70.88% dintre leziunile melanocitare, fie la periferia sau în centrul leziunii, fie focal. Astfel, studiul de față a identificat un model predominant al nevilor monitorizați în cadrul populației analizate, diagnosticate cu MPM și/sau MF, reprezentat de leziuni cu contur regulat, structuri omogene pe suprafața lezională, cel mai frecvent reticular, cu rețea pigmentară simetrică și depigmentare prezentă.

Distribuția lotului inclus în *Studiul 1.1* pe durata celor 5 ani calendaristici evaluați a indicat o scădere graduală, succesivă a cazurilor diagnosticate, din 2018 până în 2022, fapt ce poate fi corelat cu impactul pandemiei SARS-CoV-2 asupra percepției pacienților de prioritate a leziunilor dezvoltate la nivelul organului cutanat. Rezultatele *Studiului 1.2* au indicat valori medii ale indicelui Breslow inferioare în cazul celui de-al doilea melanom primar, comparativ cu primul, ceea ce dovedește utilitatea monitorizărilor periodice dermatologice și videodermatoscopice (care oferă și perspective asupra caracterului evolutiv, dinamic al leziunilor) în atingerea scopului suprem de diagnostic precoce. De asemenea, s-a remarcat faptul că sub-lotul de pacienți cu melanom familial a prezentat – în medie – de 1.17 ori mai mulți nevi decât grupul diagnosticat cu melanom primar multiplu și de 1.38 ori mai multe leziuni pigmentare benigne decât indivizii cu melanom sporadic, descoperiri ce vin în sprijinul teoriei conform căreia numărul și distribuția nevilor la nivelul suprafeței cutanate reprezintă caracteristici genetice moștenite.

4. Direcția de cercetare 2. Examinarea imunohistochimică și investigarea statusului mutațional CDKN2A în lotul de pacienți cu melanom cutaneo-mucos familial și melanom primar multiplu

În cadrul MF și al MPM, există încă lacune în ceea ce privește corelațiile clare dintre anumite mutații, precum cele identificate la nivelul genei CDKN2A, și fenotipuri sau caracteristici dermatoscopice specifice, a căror stabilire este esențială pentru a permite management-ul oncologic particular al acestei categorii de pacienți, prin introducerea lor în programe speciale de screening, respectiv de monitorizare post-diagnostic pentru detectarea precoce a primului melanom primar sau a tumorilor primare dezvoltate ulterior. Ținând cont de recomandarea de testare genetică în acele cazuri în care probabilitatea de depistare a unei mutații depășește 10%, coroborată cu istoricul personal de melanom primar multiplu sau antecedentele familiale de melanom, această parte a cercetării vizează detecția frecvenței delețiilor CDKN2A într-o populație selecționată diagnosticată cu MPM sau melanom familial și corelațiile analizei genetice cu evaluarea imunohistochimică a proteinelor asociate (p14 și p16).

Studiul 2.1 cuprinde analiza specimenelor tisulare prin aplicarea de tehnici imunohistochimice cu scopul de a detecta modelul de expresie al proteinelor p14 și p16 în melanoamele cutaneo-mucoase familiale și/sau MPM. Studiul observațional retrospectiv a fost condus pe o perioadă de 5 ani (2018-2022), pe un lot de pacienți diagnosticați cu melanom cutanat și/sau mucos, cu istoric familial pozitiv de melanom sau antecedente personale de leziuni maligne melanocitare primare. Informațiile clinice și epidemiologice, precum sexul, vârsta la diagnostic, mediul de rezidență, localizarea anatomică a melanomului, numărul total de leziuni pigmentare, au fost extrase din arhivele Serviciului Clinic de Anatomie Patologică din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență din Constanța, considerat etalon al cazuisticii din regiunea de sud-est a României. Fragmentele tisulare obținute în urma exciziei chirurgicale eliptice și a re-exciziei cu margini de siguranță adaptate particularităților fiecărui caz au fost evaluate pentru descrierea subtipului histopatologic de melanom, indicelui Breslow, ratei mitotice, prezenței/absenței invaziei limfovaskulare și perineurale, tipului infiltratului limfocitar. În continuare, a fost aplicată tehnica imunohistochimică pentru p14 și p16, conform protocolului pus la dispoziție de producător: pentru p14, reacția nucleară a fost evaluată în minim 1000 de nuclei cuprinși în proliferarea tumorală, în timp ce p16 a fost considerat a avea expresie prezentă atunci când a relevat reacții intense nucleare și citoplasmatică.

În lotul final, ce a cuprins 23 de subiecți (7 indivizi originând din familii cu minim o rudă de gradul I diagnosticată cu melanom și 16 pacienți cu MPM), vârsta medie la diagnostic a fost de 62.3 de ani, cu o distribuție pe sexe aproximativ egală, majoritatea cazurilor au fost înregistrate în

decada a opta de viață și cele mai frecvente situsuri anatomice afectate au fost reprezentate de toracele anterior/posterior. Dintre cele 23 de cazuri ce au întrunit criteriile de eligibilitate, 13 au prezentat absență imunohistochimică a p14 și/sau p16. Cazurile cu reacție absentă exclusiv a p16 au fost mai frecvent asociate cu prezența de metastaze la distanță (85.71%), comparativ cu 50.00% dintre cele 4 specimene ce au relevat pierdere exclusivă a expresiei p14. Valoarea medie a indicelui Breslow corelată cu pierderea expresiei p16 și p14 a fost de 6.79 mm, respectiv 5.37 mm. Cazurile cu pierdere exclusivă a expresiei p16 au prezentat o rată mitotică medie de 5.28/mm², comparativ cu valoarea medie de 2/mm² înregistrată în populația cu imunoexpresie p14 absentă exclusivă.

Studiul 2.2 se referă la depistarea prin metoda hibridizării fluorescente *in situ* (FISH) a statusului mutațional CDKN2A al celor 23 de mostre de melanom expuse în Studiul 2.1, investigație ce a fost efectuată în cadrul Centrului de Cercetare Dezvoltare pentru Studiul Morfologic și Genetic în Patologia Malignă (CEDMOG) din Constanța. Evaluarea prin intermediul microscopului epifluorescent (Zeiss – Axio Imager.M2, Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germania), echipat cu filtre optime și un sistem de analiză a imaginilor (MetaSystem Isis, MetaSystems Probes, Heidelberg, Germania), a urmărit criteriile de diagnostic genetic. Într-o celulă cu deleție a locusului genei CDKN2A, s-a identificat un număr redus de semnale verzi. Specimenele cu ≥ 15 nuclei în care s-a observat absența semnalelor oranj indicatoare pentru centromerul cromozomului 9 și prezența a minim două semnale verzi sugestive pentru CDKN2A au fost considerate pozitive pentru deleție homozigotă. Cazurile de deleție ce afectează parțial gena CDKN2A (heterozigotă) au putut fi obiectivate prin *pattern* de semnalizare ce a cuprins un semnal oranj și două semnale verzi de dimensiuni reduse.

Rezultatele obținute în urma studiului molecular CDKN2A prin intermediul tehnicii FISH au identificat 3 cazuri de deleție heterozigotă (13.04%), în timp ce deleții homozigote au fost obiectivate în 7 specimene (30.43%). Cazurile de disomie au fost, de asemenea, frecvente, întâlnite la 7 pacienți (30.43%) și monosomia CDKN2A a fost diagnosticată în 6 cazuri (26.08%).

Coroborarea informațiilor imunohistochimice (p14 și p16) și de biologie moleculară (CDKN2A) extrase în urma cercetării întreprinse în cadrul Studiului 2 a relevat asocierea tuturor celor 7 cazuri de deleție CDKN2A homozigotă cu pierdere imunohistochimică a marker-ului p16. În plus, 6 dintre cele 7 cazuri de deleție CDKN2A homozigotă au fost corelate cu expresie p14 absentă. Dintre pacienții incluși în cohorta de studiu personal, 8 din 10 cazuri cu absență imunohistochimică a marker-ului p16 au prezentat metastaze la momentul diagnosticului, iar cele 2 cazuri remanente cu pierdere a expresiei p16 nu au prezentat focare tumorale secundare la distanță. În lumina datelor epidemiologice, asociate cu concentrarea analizei personale asupra cazuisticii din sud-estul României, corelația dintre imunoprofilul p14-p16 și statusul genetic CDKN2A relevă semnificație statistică.

5. Direcția de cercetare 3. Evaluarea imunoreacției CD8 prin tehnica manuală versus prin intermediul inteligenței artificiale

CD8 poate funcționa ca marker prognostic, fiind asociat cu rate superioare de supraviețuire, iar înțelegerea relației dintre procentul de pozitivitate a CD8 și evoluția bolii facilitează stratificarea pacienților în funcție de prognosticul lor. În plus, obținerea valorilor procentuale de pozitivitate a limfocitelor infiltrante tumorale (TILs, *tumor-infiltrating lymphocytes*) la utilizarea imunohistochimică a CD8 și monitorizarea valorilor pre- și post-terapeutice pot oferi informații despre impactul dinamic al diferitelor strategii de tratament asupra microclimatului tumoral.

Studiul observațional retrospectiv a fost desfășurat cu focus pe o perioadă de 5 ani (2018-2022), cuprinzând pacienți diagnosticați cu melanom cutanat și/sau mucos, cu istoric familial pozitiv pentru melanom sau antecedente personale pozitive pentru alte melanoame primare, cazuri extrase din bazele de date fizică și digitală ale Serviciului Clinic de Anatomie Patologică din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență "Sf. Apostol Andrei" din Constanța.

Cele mai reprezentative 23 de preparate microscopice evaluate au fost selectate pentru efectuarea testelor imunohistochimice CD8, iar o regiune specifică de focus a fost aleasă în cadrul ariei de invazie tumorală pentru fiecare mostră tisulară și scorificată cu valorile 0 sau 1, în funcție de absența sau prezența celulelor CD8-pozitive. Limfocitele în contact direct cu marginile tumorale sau cuprinse în populația celulară malignă au fost etichetate drept "intratumorale", în timp ce acelea situate extern au fost considerate "peritumorale". Reacțiile au fost considerate pozitive atunci când >5% din TILs au prezentat diferite grade de intensitate a colorării. Ulterior, toate preparatele au fost scanate cu ajutorul *scanner*-ului Huron LE120TM 4000XT (Huron Technologies International Inc., St. Jacobs, ON, Canada), în cadrul Centrului de Cercetare Dezvoltare pentru Studiul Morfologic și Genetic în Patologia Malignă (CEDMOG) din Constanța. Pentru fiecare preparat histologic, a fost obținută o imagine întreagă a unei lame de microscop (WSI, *whole slide image*) ce a fost, ulterior, vizualizată prin software-ul HuronViewer™, în timp ce analiza imaginilor a fost efectuată prin intermediul platformei QuPath (versiunea 0.4.3), ce utilizează inteligență artificială proprietară, bazată pe învățare automată ("machine learning").

Cohorta finală ce a respectat criteriile de includere a cuprins, în perioada de 5 ani studiată, 23 de pacienți: 7 originari din familii cu minim o rudă de gradul I diagnosticată cu melanom și 16 indivizi cu melanom primar multiplu; pentru aceștia din urmă, a fost aleasă o singură tumoră primară în vederea procesării imunohistochimice.

În ceea ce privește examinările manuale, procentul mediu de nuclei CD8-pozitivi peritumorali în contextul lotului studiat a fost de $13.47\% \pm 22.81$, în timp ce indicele procentual mediu al nucleilor intratumorali ce a exprimat pozitivitate CD8 imunohistochimică a fost de $20.86\% \pm 24.65$. Procentul mediu de TILs CD8-pozitive intratumorale și peritumorale în categoria MES a fost de 14.23%, respectiv 16.53%. Pe de altă parte, melanoamele nodulare au prezentat o valoare procentuală medie de 26.11% în contextul TILs intratumorale cu pozitivitate CD8 și 10.55% în contextul celulelor T din infiltratul peritumoral. Unicul caz de melanom lentiginos acral a relevat pozitivitate CD8 de 60.00% la nivel intratumoral și absența pozitivității CD8 în mediul celular T peritumoral.

Dintre cele 23 de cazuri prelucrate prin intermediul marker-ului CD8, doar 56.52% au putut fi examinate suplimentar, în manieră optimă, via QuPath. Celelalte 10 mostre tisulare nu au generat rezultate cuantificabile prin prisma artefactelor determinate de fazele de procesare pre-analitică și analitică. Examinarea automatizată a determinat un procent de nuclei CD8-pozitivi peritumorali de 45.49%, în timp ce rezultatele evaluărilor "cu ochiul liber" au identificat o medie de 24.23%. Matricea de covarianță inter-elemente a relevat o relație lineară pozitivă între "QuPath" și "Examinator Uman", dat fiind că indicele de covarianță (99.236) a fost substanțial, expunând faptul că – atunci când una dintre variabile tinde să devieze față de medie – cealaltă menține aceeași tendință. În manieră adițională, atât "QuPath", cât și "Examinator Uman" au exprimat variație notabilă, semnificând alterație considerabilă în cadrul fiecărei variabile. Aceste descoperiri au sugerat o conexiune semnificativă între cele două elemente și au subliniat variabilitatea lor individuală.

În studii viitoare, numărul de cazuri analizate va fi extins, astfel ținând spre verificarea modificărilor în ceea ce privește semnificația statistică. În studiul personal, nu a existat o corelație inversă semnificativă între numărul crescut de TILs CD8-pozitive și progresia melanomului, această idee fiind sprijinită de cazurile cu metastaze viscerale multiple și procent elevat de celule CD8 pozitive în infiltratul peritumoral, precum și de mostrele tisulare prelevate de la pacienții fără metastaze de organ la distanță care au prezentat un număr redus de limfocite cu pozitivitate CD8. Potențialul rol molecular al mutației CDKN2A asupra ratelor de supraviețuire ale pacienților CDKN2A-mutanți trebuie investigat în amănunt pentru a confirma posibilele mecanisme de acțiune ce pot fi targetate de terapiile specifice *novel*.

6. Direcția de cercetare 4. Mijloacele de informare digitale și aportul asupra prevenției și diagnosticului precoce de melanom

Digitalizarea accelerată a fost precipitată atât de utilizarea masivă generată de către pacienți, cât și de alăturarea semnificativă a 65% dintre profesioniștii din domeniul medical în rândul utilizatorilor de rețelele sociale.

Obiectivele studiului curent au fost de a identifica rolul *social media* în augmentarea conștientizării asupra melanomului cutaneo-mucos. În consecință, au fost extrași cei mai frecvenți factori de risc și cele mai comune malpractici ale profilaxiei primare/secundare și s-a ținut prezentarea corelației dintre diferite tipuri de utilizare a rețelelor și gradele variate de responsabilitate personală în evitarea comportamentelor specifice cu risc crescut.

Acest studiu observațional a fost bazat pe chestionare electronice care au inclus 20 de întrebări, divizate în 4 categorii: (1) caracteristicile generale ale pacientului, (2) tipurile de utilizare a *social media* și opinia despre rolul său modificator al atitudinilor de prevenție a melanomului, (3) aplicabilitatea personală a comportamentelor corecte de helioprevenție, și (4) date despre istoricul personal și familial de melanom și nevi Clark (nevi displazici). Acestea au fost diseminate către populația generală, pe parcursul a 4 săptămâni consecutive, în perioada ianuarie – februarie 2023, prin intermediul canalelor *online*, cu scopul de a extrage date calitative legate de relația dintre *social media*, variabilele epidemiologice și comportamentele asociate dezvoltării melanomului, respectiv practicile de protecție solară. Platforma ce a găzduit chestionarul pe parcursul desfășurării studiului a fost reprezentată de SurveyPlanet (PollDeep, Inc., Hamilton HM, Bermuda), iar informațiile obținute au fost exportate și stocate sub formă de documente Excel (Microsoft Office, SUA) pentru analiză și prelucrare.

Strategia de extracție a urmat principiile eșantionării în lanț (“chain sampling”), reprezentate de procesul ce implică prelevarea unui prim eșantion de participanți dintr-un lot, care, dacă este acceptat în urma analizei preliminare, atrage după sine aprobarea întregului lot de respondenți. Prin intermediul acestei metode, baza de date finală a inclus 221 de persoane cu vârsta medie între 26-35 de ani, distribuție sex feminin:sex masculin de 3.5:1 și rezidență majoritară în arii urbane (71.94%). Dintre utilizatorii de *social media* evaluați, 44.79% au declarat că urmăresc în mod activ conținut medical educațional pe canalele virtuale, cei mai mulți (80.99%) au declarat că utilizează produse cu factor de protecție solară, 54.29% poartă ochelari de soare special echipați cu filtru UV, iar 53.84% evită expunerea UV în intervalul orar 10:00-16:00.

Rugați să evalueze, pe o scală de la 1 (deloc aplicabil) la 10 (aplicabil, superpozabil), nivelul la care o anumită măsură de prevenție solară se încadrează în regimul lor, valoarea medie atribuită utilizării de creme/loțiuni/spray-uri cu factor de protecție solară (SPF, *sun protection factor*) și

reaplicarea lor la fiecare două ore sau după transpirație/ intrare în piscină/mare a fost 6.77, iar portul de îmbrăcăminte care acoperă o suprafață cutanată extinsă și/sau a articolelor vestimentare cu filtru UV a înregistrat o medie de 5.86. În această secțiune, evitarea expunerii solare în intervalul orar 10:00-16:00 a atins cel mai înalt scor, de 7.3. Referitor la sfaturile dermatologice transmise pe rețelele sociale care au fost încorporate în practica lor, participanților le-au fost oferite opțiuni care definesc cele mai frecvente sugestii elaborate de către dermatologi în mediul digital, reprezentând grade diferite de conștientizare și responsabilitate. În total, 50.67% dintre indivizii incluși în studiu au afirmat că nu mai merg la plajă fără să folosească produse cu SPF, 46.15% au renunțat la băile de soare la ore nepotrivite, iar 45.70% au început să evite expunerea solară de orice natură între orele 10:00 și 16:00, respectiv 47.51% au integrat aplicarea filtrului ecran în rutina zilnică, în timp ce 38.00% au învățat modul corect de dozare și acoperire a organului cutanat cu SPF. În contrast, doar 12.21% dintre respondenți au raportat faptul că nu au accesat în mod activ nicio practică dermatologică diseminată *online*.

În această analiză, a fost testată ipoteza conform căreia o aplicabilitate mai mare a recomandărilor dermatologice diseminate prin intermediul *social media* ar fi coroborată cu anumite caracteristici epidemiologice specifice ale participanților. În primul rând, asocierea dintre vârsta mai tânără (sub 35 de ani) și adopția proeminentă a practicilor corespunzătoare de îngrijire dermatologică a fost confirmată, datorită valorilor pozitive ale determinantului de covarianță (0.02-0.05), dar nu a putut fi considerată semnificativă conform coeficienților de corelație ce au variat între 0.09 și 0.23 și au evidențiat o corelație slabă. În al doilea rând, legătura dintre mediul urban de reședință – luând în considerare accesibilitatea crescută la tehnologie – și achiziția superioară a practicilor de fotoprotecție a fost neglijabilă, precum a indicat analiza de covarianță (cu rezultate cuprinse între 0.005 și 0.008), coroborată cu coeficienții de corelație (0.05-0.08).

În cea de-a treia secțiune, dedicată aplicabilității personale a comportamentelor corecte de protecție solară, am descoperit că numai 21.26% dintre participanți au beneficiat de control dermatologic anual sau de 2-4 ori pe an, în conformitate cu particularitățile și antecedentele cutanate, iar vasta majoritate (63.34%) a declarat că nu a efectuat niciodată evaluări dermatoscopice sau videodermatoscopice.

Ulterior, referitor la istoricul personal și familial de nevi displazici, 2.26% dintre participanți au fost diagnosticați cu nevi Clark, iar 1.35% dintre ei proveneau din familii cu minim o rudă de gradul I cu diagnosticul antedescris. În ceea ce privește antecedentele de melanom, doar 3 respondenți (1.35%) originau din familii cu un membru afectat de această patologie oncologică, în timp ce niciunul dintre cei intervievați nu prezenta istoric personal de melanom.

Pentru a evalua comprehensiv rolul canalelor virtuale în propagarea informațiilor antemenționate, în cadrul studiului au fost alese platformele Instagram și Facebook ca site-uri principale de publicare a link-ului ce ghida populația interesată către chestionarul electronic. Pe parcursul celor 60 de zile de status activ, formularul a fost majoritar accesat prin intermediul Instagram, dovedind atribuția-cheie a acestei platforme în industria digitală și potențialul de a deveni un instrument eficient din punct de vedere financiar, cvasi-lipsit de subiectivitate, util pentru diseminarea datelor științifice și sfaturilor medicale dermatologice. Durata scurtă de timp necesară pentru obținerea a 221 de răspunsuri valide pledează în manieră adițională pentru utilizarea canalelor virtuale, în detrimentul formularelor convenționale de colectare a datelor sau a arhivelor medicale standard. În urma analizei efectuate, se consideră faptul că acest tip particular de chestionar electronic nu generează doar datele statistice asupra comportamentelor de screening dermato-oncologic, dar poate acționa – de asemenea – ca instrument de creștere a conștientizării

asupra abordării helioprotective optime și a vizitelor dermatologice efectuate la intervale corecte, individualizate, în special atunci când înglobează noțiuni cu fundament științific și când este elaborat de către un medic.

Sunt esențiale studii suplimentare ce să investigheze caracteristicile audienței-țintă pentru o adresabilitate crescută a recomandărilor dermatologice. Criteriile ce pot fi explorate în viitor ca potențiali factori de influență pentru design-ul campaniilor de creștere a conștientizării asupra cancerelor cutanate sunt statusul socioeconomic, statutul marital sau profesia participanților.

7. Direcția de cercetare 5. Crearea unui algoritm de monitorizare imunofenotipică personalizată a pacienților cu melanom familial și melanom primar multiplu, cu status mutațional CDKN2A variabil

Alterările genei supresoare tumorale CDKN2A (p16INK4a) au fost demonstrate încă din trecut a juca un rol important în anumite tipuri tumorale, iar proteina p16 corespunzătoare acestora acționează prin blocarea progresiei asociate ciclului celular prin intermediul efectului său inhibitor asupra căii ciclului D/CDK2-pRb. Studiile recente din domeniul dermatopatologiei arată utilitatea majoră a imunohistochemiei (IHC) în diagnosticul corect și exhaustiv al tumorilor melanocitare maligne.

Având în vedere prevalența covârșitoare a melanomului, costurile asociate diagnosticului și tratamentului sunt majorate exponențial. Din acest motiv, noi abordări de selecție a pacienților pentru diversele tipuri de terapii bine cunoscute sau *novel* sunt necesare, cu scopul de a obține rate optime de răspuns la tratament în sincron cu cost-eficiența investigațiilor diagnostice efectuate.

În studiul de față au fost evaluați 23 de pacienți, dintre care 7 diagnosticați cu melanom familial și 13 cu melanom primar multiplu, identificați pe o perioadă de 5 ani (2018-2022); astfel, numărul total de tumori primare identificate a fost de 50. Dintre acestea, s-au selectat cele mai reprezentative tumori melanocitare maligne pentru fiecare caz în parte, favorizându-le pe cele cu țesut și lame conservate optim, și s-au practicat tehnicile IHC asupra unei tumori-surogat per pacient, în asemenea manieră încât – în cadrul studiului – numărul de tumori examinate imunohistochemic a fost egal cu numărul de pacienți incluși. Au fost, ulterior, urmăriti parametri epidemiologici, precum vârsta la diagnostic și sexul pacientului, clinici (localizarea anatomică a tumorii/tumorilor primare) și caracterele histopatologice (subtip histopatologic de melanom, indice Breslow, activitate mitotică).

Tehnicile imunohistochemice utilizate au cuprins proteina p16 (clona MX007, Master Diagnostica), anticorpul Ki-67 (clona SP6, Biocare) și markerul CD8 (clona SP16, Master Diagnostica). Indicele Ki-67 a fost determinat în aria cu proliferarea cea mai intensă și cu absența infiltratului inflamator major, criterii evaluate la magnificație joasă (x10), în “hot spot”. Procentul de nuclei colorați cu diaminobenzidină (DAB) a fost estimat în aproximativ 200 de celule tumorale. Modalitatea de analiză procentuală a celulelor Ki-67-pozitive a fost, astfel, utilizată, precum în cazul proteinei p16, pentru care s-a obținut procentul de celule imunomarcate, clasificat la nivel citoplasmatic, nuclear sau citoplasmatic și nuclear.

În ceea ce privește analiza genetică a mutațiilor CDKN2A, aceasta s-a efectuat prin intermediul hibridizării fluorescente *in situ* (FISH), conform specificațiilor descrise în cadrul Studiului 2.2. Evaluarea inițială a fost efectuată, în mod individual, pentru fiecare variabilă imunohistochimică (p16, CD8, Ki-67), în urma caracterizării tumorilor incluse în studiu ca CDKN2A-mutante

(categorie ce a cuprins delețiile homo- sau heterozigote), respectiv ca CDKN2A-nonmutante/*wild-type* (clasă în care au fost integrate cazurile cu disomie sau monosomie).

Pe baza datelor obținute post-procesare prin intermediul proteinei p16, markerului CD8 și indicelui Ki-67, a fost, inițial, efectuată o analiză comparativă a rezultatelor celor 3 parametri în cadrul categoriei de MPM și MF cu mutație CDKN2A sau cu absența acesteia. Cu ajutorul corelațiilor obținute între diverse valori ale celor 3 indicatori anteexpuși și datele furnizate în literatura de specialitate, au fost considerate sistemele de scorificare individuală (per parametru), cu diverse limite stabilite în funcție de semnificația clinică, diagnostică sau evolutivă pe care o comportă. Scopul final a fost de a obține un algoritm semi-cantitativ de evaluare a celor două contexte mutaționale. Cele două sub-loturi (denumite sintetic "CDKN2A-wt" și "CDKN2A-mut") au fost, apoi, divizate aleatoriu în câte două părți aproximativ egale: prima parte a fiecăruia (setul-test) a fost utilizată pentru obținerea valorilor totale ale scorului triplu p16-CD8-Ki-67, în timp ce a doua parte (setul de validare) a cuprins cazurile analizate pentru confirmarea acurateții metodei și a performanței scorului propus.

Cazurile cu expresie CDKN2A mutantă au totalizat 10 pacienți, în timp ce 13 mostre tisulare au relevat absența mutației genice antemenționate. Evaluarea individuală p16 a înregistrat o valoare medie de 42.30% în MPM și melanoamele familiale fără mutație CDKN2A, respectiv 15.00% în categoria de pacienți cu deleții homo- sau heterozigote ale genei CDKN2A. Valoarea medie a limfocitelor peritumorale CD8-pozitive în sub-lotul de pacienți CDKN2A-mutanți a fost de 5.00%, în timp ce cazurile fără alterări genice CDKN2A identificate biomolecular au fost asociate cu un procent mediu de TILs peritumorale cu expresie CD8 păstrată de 19.61%. În continuare, s-a remarcat faptul că expresia Ki-67 în categoria indivizilor cu melanoame primare multiple și familiale care au evidențiat mutație CDKN2A la examinarea via FISH a fost mai accentuată (42.50%), în comparație cu lotul de pacienți CDKN2A-wt, în care valoarea medie detectată a fost de 35.38%.

Coroborând datele de corelație status mutațional-localizare cu cele de relație sex-localizare, ipoteza logică extrasă ar fi de predominanță a tumorilor CDKN2A-wt la pacienții de sex masculin și a celor cu deleții CDKN2A la sexul feminin. Această supoziție a fost sprijinită de rezultatele obținute anterior, ce au arătat un procent de 61.53% de tumori CDKN2A-wt la sexul masculin și o alocare de 50.00% dintre melanoamele CDKN2A-mut în rândul sexului feminin. De asemenea, s-a remarcat absența diferențelor statistice ale distribuției MPM-MF, indiferent de semnăturile mutaționale asociate genei CDKN2A.

Pe baza rezultatelor obținute prin analiza individuală a parametrilor considerați în studiul de față, obiectivul a constat în crearea unui scor ale cărui valori progresiv superioare să fie superpozabile acelor cazuri cu prognostic nefavorabil, corespunzător tumorilor cu mutație CDKN2A, spre deosebire de valori totale inferioare aplicabile cazurilor CDKN2A-wt. În acest sens, procentul de celule p16-pozitive a fost stratificat prin intermediul unei scale digresive cu 4 clase: expresie prezentă în >50% din celule (scor 0), în 11-50% (scor 1), 1-10% (scor 2) și absență completă a imunoreacției p16 (scor 3). Semnificația anticorpului CD8 în populația limfocitară peritumorală a fost interpretată în funcție de *pattern*-urile evolutive și de responsivitate la tratament remarcate în cadrul lotului de studiu prezent și în cercetări anterioare; de aceea, valorile-limită considerate pentru scorificare au fost: colorare intensă a TILs peritumorale cu CD8 >60% (scor 0), intensitate moderată, 20-60% TILs CD8-pozitive (scor 1), intensitate scăzută <20% (scor 2) și absența TILs peritumorale (scor 3). Cuantificarea indicelui de proliferare Ki-67 s-a bazat pe utilizarea unei scale progresiv-descendente cu 5 clase, ce determină caracterizarea neoplazică de la

tumorile mai puțin proliferative (scor 0) la cele intens proliferative (scor 4): inferior valorii de 2% (scor 0), 2-5% (scor 1), 6-10% (scor 2), 11-20% (scor 3) și superior valorii de 20% (scor 4). În acest context global, valoarea totală după efectuarea scorului propus per tumoră a variat între 0 și 10.

S-a remarcat faptul că limita de 9 a scorului triplu diferențiază melanoamele cu deleție CDKN2A homozigotă de tumorile CDKN2A-wt și cu deleție heterozigotă. Toate cele 8 cazuri de melanom cutaneo-mucos primar multiplu/familial cu deleție homozigotă CDKN2A au corespuns scorului total ≥ 9 . În plus, la setarea limitei de detecție a melanoamelor cu deleție CDKN2A homozigotă la o valoare totală de minim 9, sensibilitatea testului este de 100%, iar specificitatea de 94.11%.

Astfel, asocierea celor 3 parametri incluși în sistemul de scorificare a fost efectuată prin prisma utilității dovedite a p16, CD8 și Ki-67 în evoluția cazurilor de melanom cutaneo-mucos. Limitările studiului personal implică numărul scăzut de pacienți care au întrunit criteriile de includere în perioada de timp evaluată. În plus, valorile de *cut-off* pentru fiecare dintre cei trei parametri examinați imunohistochimic (p16, CD8, Ki-67) au fost stabilite pe baza cercetărilor anterioare ce au avut ca viză trasarea corelațiilor dintre caracteristicile IHC ale melanomului cutaneo-mucos la diagnostic și modelele de evoluție identificate în timp; cu toate acestea, trebuie recunoscut potențialul de *bias* al confirmării survenit prin prisma heterogenității datelor disponibile la acest moment în literatura de specialitate.

Pentru standardizarea și creșterea utilizării sistemului de scorificare p16-CD8-Ki-67 în predicția statusului mutațional CDKN2A la indivizii cu dovezi clinice pentru melanom primar multiplu și/sau familial, sunt necesare studii cu design comprehensiv efectuate pe un lot mai extins de pacienți sau chiar integrarea sa în studii clinice pe scară largă.

8. Concluzii generale

În concluzie, distribuția lotului de studiu pe durata celor 5 ani calendaristici evaluați a indicat o scădere graduală, succesivă a cazurilor diagnosticate, din 2018 până în 2022, fapt ce poate fi corelat cu impactul pandemiei SARS-CoV-2 asupra percepției pacienților de prioritate a leziunilor dezvoltate la nivelul organului cutanat. Melanomul extensiv în suprafață a constituit cel mai comun subtip histopatologic atât în populația investigată cu melanom sporadic, cât și în cea diagnosticată cu MPM și/sau melanom familial.

În populația cu melanom primar multiplu, indicele Breslow identificat în cazul celui de-al doilea melanom primar a prezentat valori medii inferioare celor înregistrate pentru primul melanom primar. În ceea ce privește modelul dermatoscopic predominant al nevilor monitorizați în cadrul populației cu MPM și/sau MF, acesta a fost reprezentat de leziuni cu contur regulat, structuri omogene pe suprafața lezională, cel mai frecvent reticulare, cu rețea pigmentară simetrică și depigmentare prezentă.

Studiul doctoral a relevat faptul că investigația imunofenotipului p14-p16 la pacienții cu melanoame familiale și MPM reprezintă o modalitate utilă și cost-eficientă pentru stabilirea profilului genetic CDKN2A al acestui grup populațional. Absența imunohistochimică a p16 are valoare predictivă pentru comportamentul biologic agresiv și prognosticul nefavorabil al MPM și/sau MF, indiferent de subtipul histopatologic. Melanoamele cu încărcătură mutațională dublă (BRAF și CDKN2A) sunt mai frecvent asociate cu metastaze la distanță, deci se corelează cu agresivitate crescută și evoluție fulminantă.

Ținând cont de plasarea în era patologiei digitale rapid evolutive, utilizarea *software*-urilor automatizate de scanare a imaginilor capătă popularitate, în detrimentul examinărilor microscopice "cu ochiul liber". Acuratețea și replicabilitatea rezultatelor obținute prin intermediul tehnicilor de inteligență artificială sunt superioare celor raportate în urma evaluărilor efectuate de examinatori umani. Un procentaj mai crescut de limfocite CD8-pozitive intratumorale versus stromale a fost asociat în manieră pozitivă cu acele cazuri cu multiple localizări metastatice.

În manieră similară, accesul actual ubicuitar la tehnologie contribuie la transformarea rețelelor sociale în medii ideale pentru diseminarea și organizarea de campanii viitoare de conștientizare cu privire la afecțiunile dermato-oncologice. Având în vedere proporția scăzută a indivizilor care efectuează vizite dermatologice și evaluări dermatoscopice periodice, se identifică necesitatea implementării de numeroase programe educaționale pe scară largă asupra acestei teme, cu scopul de a atrage atenția populației generale.

În final, algoritmul compus din parametrii imunohistochimici p16-CD8-Ki-67, selectați pe baza importanței lor prognostice și evolutive, reprezintă un valoros instrument de diagnostic auxiliar în detecția MPM și MF cu deleție homozigotă CDKN2A, ca măsură cost-eficientă de predicție a statusului mutațional. Coroborând semnificația celor trei indicatori incluși în scorul imunohistochimic propus, rezultatele derivate din studiul personal și datele existente în literatura de specialitate, explorarea utilității algoritmului antemenționat în distincția nev atipic-melanom constituie o viitoare direcție de cercetare validă.

9. Originalitatea tezei

- Primul studiu care investighează prezența mutației CDKN2A într-un lot de pacienți din sud-estul României diagnosticați cu melanom familial și/sau melanom primar multiplu, atât prin metode imunohistochimice (prin intermediul proteinelor p14 și p16), cât și prin tehnica hibridizării fluorescente *in situ* (FISH).
- Prima analiză care evaluează reacția CD8 în populația limfocitară intra- și peritumorală, prin intermediul inteligenței artificiale (*software* QuPath), concomitent și comparativ cu examinarea clasică efectuată de medicii anatomo-patologi, "cu ochiul liber", în contextul cazurilor de melanom familial și/sau melanom primar multiplu diagnosticate în regiunea Dobrogei.
- Prima cercetare care propune utilizarea unui sistem de scorificare standardizat, ce apelează exclusiv la anticorpi imunohistochimici uzuali (p16, CD8 și Ki-67), pentru distincția dintre melanoamele familiale și/sau primare multiple cu deleție CDKN2A homozigotă și cele fără mutație CDKN2A sau cu deleție heterozigotă a acestei gene.
- Datele adiționale, centrate pe melanomul cutaneo-mucos depistat în populația din România, obținute în urma cercetării doctorale personale, întregesc tabloul informațional existent în literatura de specialitate și dobândesc utilitate particulară în caracterizarea epidemiologică, clinică, histopatologică și imunofenotipică a acestei entități nosologice.
- Rezultatele derivate în urma analizei efectuate în lucrarea de față pot constitui punctul de plecare pentru direcții ulterioare de cercetare în domeniul biomarkerilor asociați melanomului familial și melanomului primar multiplu sau pentru dezvoltarea de terapii țintite asupra CDKN2A.

Bibliografie selectivă

1. D'Ecclesiis O, et. Al. Gender-Dependent Specificities in Cutaneous Melanoma Predisposition, Risk Factors, Somatic Mutations, Prognostic and Predictive Factors: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Jul 27;18(15):7945. doi: 10.3390/ijerph18157945.
2. Schwartz MR, Luo L, Berwick M. Sex Differences in Melanoma. *Curr Epidemiol Rep*. doi: 10.1007/s40471-019-00192-7
3. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, Melchi CF, Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer*. 2005 Jan; 41(1):45-60
4. Yashin A, Yashin Y, Wang JY, Nemzer B, Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. *Antioxidants (Basel)*. 2013 Oct 15; 2(4):230-45.
5. Fitzpatrick. *Fitzpatrick's Color Atlas and Synopsis of Clinical Dermatology*. New York: McGraw-Hill Medical Pub. Division, 2005.
6. Keung EZ, Gershenwald JE. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018;18(8):775-784. doi:10.1080/14737140.2018.1489246
7. Demierre MF, Chung C, Miller DR, Geller AC. Early detection of thick melanomas in the United States: Beware of the nodular subtype. *Arch Dermatol*. 2005;141:745-750.
8. Pollack LA, Li J, Berkowitz Z, et al. Melanoma survival in the United States, 1992 to 2005. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(5 Suppl 1):S78-S86
9. Stenehjem JS et al. Anthropometric factors and Breslow thickness: prospective data on 2570 cases of cutaneous melanoma in the population-based Janus Cohort. *Br J Dermatol*. 2018 Sep;179(3):632-641. doi: 10.1111/bjd.16825. Epub 2018 Jul 26. PMID: 29858512.
10. Petrelli F, et al. Prognostic and predictive role of elevated lactate dehydrogenase in patients with melanoma treated with immunotherapy and BRAF inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Melanoma Res*. 2019 Feb;29(1):1-12. doi: 10.1097/CMR.0000000000000520.
11. Von Schuckmann LA, et al. Risk of Melanoma Recurrence After Diagnosis of a High-Risk Primary Tumor. *JAMA Dermatol*. 2019;155(6):688-693. doi:10.1001/jamadermatol.2019.0440
12. Trotter SC, et al. A Global Review of Melanoma Follow-up Guidelines. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2013 Sep; 6(9): 18-26
13. Dummer R, Guggenheim M, Arnold AW, et al. Updated Swiss guidelines for the treatment and follow-up of cutaneous melanoma. *Swiss Med Wkly* 2011; 141: w13320
14. Gaudy-Marqueste C, Wazaefi Y, Bruneu Y, et al. Ugly Duckling Sign as a Major Factor of Efficiency in Melanoma Detection. *JAMA Dermatol*. 2017;153(4):279-284. doi:10.1001/jamadermatol.2016.5500
15. Urso C. Are growth phases exclusive to cutaneous melanoma? *J Clin Pathol*. 2004 May; 57(5): 560. doi: 10.1136/jcp.2003.014852
16. Wang SQ, Marghoob AA, Scope A. Principles of dermoscopy and dermoscopic equipment. In: MarghoobAA, MalvehyJ, BraunRP, eds. *Atlas of Dermoscopy*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2012:3-9.
17. Braun R, Kerl K. Pigment network. *Dermoscopedia website*. Disponibil online: https://dermoscopedia.org/w/index.php?title=Pigment_network&oldid=8661. Updatat 3 noiembrie 2017. Accesat pe 26 ianuarie 2022.
18. Slutsky JB, Marghoob AA. The zig-zag pattern of lentigo maligna. *Arch Dermatol*. 2010;146(12):1444. doi:10.1001/archdermatol.2010.307

19. Braun R, Kerl K. Negative pigment network. Dermoscopedia website. Disponibil online: https://dermoscopedia.org/w/index.php?title=Negative_Pigment_Network&oldid=6858. Updatat 14 august 2017. Accesat pe 26 ianuarie 2022
20. Braun R, Kerl K. Dots. Dermoscopedia website. Disponibil online: <https://dermoscopedia.org/w/index.php?title=Dots&oldid=9836>. Updatat 22 decembrie 2017. Accesat pe 26 ianuarie 2022.
21. Braun R, Kerl K. Globules. Dermoscopedia website. Disponibil online: <https://dermoscopedia.org/w/index.php?title=Globules&oldid=8883>. Updatat 8 noiembrie 2017. Accesat pe 26 ianuarie 2022.
22. Braun R. Blue white veil. Dermoscopedia website. Disponibil online: https://dermoscopedia.org/w/index.php?title=Blue_white_veil&oldid=12460. Updatat 8 iulie 2018. Accesat pe 26 ianuarie 2022.
23. Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S, et al. Dermoscopy of pigmented skin lesions: results of a consensus meeting via the internet. *J Am Acad Dermatol*. 2003;48(5):679-693. doi:10.1067/mjd.2003.281
24. Braun R, Kerl K. Regression structures/blue-white structures. Dermoscopedia website. Disponibil online: https://dermoscopedia.org/Regression_structures/_Blue_white_structures. Updatat 8 iulie 2018. Accesat pe 26 ianuarie 2022.
25. Menzies SW, Kreusch J, Byth K, et al. Dermoscopic evaluation of amelanotic and hypomelanotic melanoma. *Arch Dermatol*. 2008;144(9):1120-1127. doi:10.1001/archderm.144.9.1120
26. Marchell R, Marghoob AA, Braun RP, Argenziano G. Dermoscopy of pigmented Spitz and Reed nevi: the starburst pattern. *Arch Dermatol*. 2005;141(8):1060. doi:10.1001/archderm.141.8.1060
27. Walia R, et al. Spindle Cell Melanoma: A Comparison of the Cytomorphological Features with the Epithelioid Variant. *Acta Cytologica* 2013;57:557-561. <https://doi.org/10.1159/000354405>
28. Emanuel P, et al. Melanoma pathology. Online: DermNet NZ. 2013
29. Yao Z, Yaeger R, Rodrik-Outmezguine VS et al. Tumours with class 3 BRAF mutants are sensitive to the inhibition of activated RAS. *Nature* 2017; 548(7666): 234–238
30. van der Rhee JI, Krijnen P, Gruis NA, et al. Clinical and histologic characteristics of malignant melanoma in families with a germline mutation in CDKN2A. *J Am Acad Dermatol*. 2011; 65: 281-288 <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.06.044>
31. Ipenburg NA, et al. Lack of association between CDKN2A germline mutations and survival in patients with melanoma: A retrospective cohort study. *Journal of American Academy of Dermatology*. Published: October 22, 2021. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2021.10.024>
32. Curtin JA, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005 Nov 17; 353(20):2135-47

Lista de publicații

1. **Luana-Andreea Nurla**, Mariana Așchie, Georgeta Camelia Cozaru, Mădălina Boșoteanu. Multiple Primary Melanoma Associated with CDKN2A Mutation – Case Report and Review of the Literature. 2024. *Medicina (Kaunas)*;60(5):763. ISSN: 1648-9144 (electronic); 1010-660X (print). *ISI (Factor de Impact 2.6)*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38792946/>. doi:10.3390/medicina60050763.
2. **Luana-Andreea Nurla**, Emma Gheorghe, Mariana Așchie, Georgeta Camelia Cozaru, Cristian Ionut Orășanu, Mădălina Boșoteanu. 2024. P16-CD8-Ki67 Triple Algorithm for Prediction of CDKN2A Mutations in Patients with Multiple Primary and Familial Melanoma. *Diagnostics (Basel)*.13;14(8):813. ISSN: 2075-4418. *ISI (Factor de Impact 3.0)*. <https://www.mdpi.com/2075-4418/14/8/813>. doi:10.3390/diagnostics14080813. PMID: 38667459; PMCID: PMC11049611
3. **Luana-Andreea Nurla**, Ana-Maria Forsea. Melanoma Epidemiology in Europe: What is New? 2024. *Italian Journal of Dermatology and Venereology*;159(2):128-134. ISSN: 2784-8450 (electronic), 2784-8671 (print). *ISI (Factor de Impact 1.8)*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38650494/>. doi:10.23736/S2784-8671.24.07811-3. PMID: 38650494
4. **Luana-Andreea Nurla**, Gina Wafi, Raluca Tatar, Alexandra Maria Dorobanțu, Mădălina Chivu, Liliana Gabriela Popa, Călin Giurcăneanu, Olguța Anca Orzan. 2024. Recent-Onset Melanoma and the Implications of the Excessive Use of Tanning Devices – Case Report and Review of the Literature. *Medicina (Kaunas)*;60(1):187. ISSN: 1648-9144 (electronic); 1010-660X (print). *ISI (Factor de Impact 2.4)*. <https://www.mdpi.com/1648-9144/60/1/187>. doi:10.3390/medicina60010187. PMID: 38276066; PMCID: PMC10821341.
5. **Luana-Andreea Boșoteanu**, Emma Gheorghe, Mariana Așchie, Georgeta Camelia Cozaru, Mariana Deacu, Gabriela Izabela Bălțătescu, Cristian Ionuț Orășanu, Mădălina Boșoteanu. 2023. CD8-Lymphocytic Phenotype Significance in Primary Multiple and Familial Melanoma with Various CDKN2A Mutational Status. *Medicina (Kaunas)*;59(12):2151. ISSN: 1648-9144 (electronic); 1010-660X (print). *ISI (Factor de Impact 2.4)*. <https://www.mdpi.com/1648-9144/59/12/2151>. doi:10.3390/medicina59122151
6. **Luana-Andreea Boșoteanu**, Emma Gheorghe, Mariana Așchie, Georgeta Camelia Cozaru, Mariana Deacu, Gabriela Izabela Bălțătescu, Cristian Ionuț Orășanu, Mădălina Boșoteanu. 2023. Immunophenotypic p14 and p16 correlations with CDKN2A mutations in primary multiple and familial melanoma: An observational study. *Medicine (Baltimore)*;102(51):e36756. ISSN: 1536-5964 (online). *ISI (Factor de Impact 1.4)*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38134090/>. doi:10.1097/MD.00000000000036756
7. **Luana-Andreea Boșoteanu**, Mariana Așchie, Mădălina Boșoteanu. 2023. Online Doc: Is Social Media Education a Tool for Melanoma Prevention? A Survey-Based Analysis Among Romanian Digitally Active Users. *Cureus*;15(12):e50328. ISSN:2168-8184. *ISI (Factor de Impact 1.2)*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38205467/>. doi:10.7759/cureus.50328
8. Mădălina Boșoteanu, Miruna Cristian, Mariana Așchie, Radu Andrei Baz, Alina Marta Zielonka, Georgeta Camelia Cozaru, **Luana-Andreea Boșoteanu**. 2023. The Malignant Gastrointestinal Neuroectodermal Tumor (GNET): A Distinct Entity and the Challenging Differential Diagnosis with Mesenchymal, Lymphoid, and Melanic Tumors: A Case Report and Brief Review of the Literature. *Diagnostics*;13(6):1131. ISSN: 2075-4418. *ISI (Factor de*

- Impact 3.0*). <https://www.mdpi.com/2075-4418/13/6/1131>. doi:10.3390/diagnostics13061131. PMID: 36980439; PMCID: PMC10047330.
9. **Luana-Andreea Boşoteanu**, Mariana Aşchie, Cristian Ionuț Orășanu, Mădălina Boşoteanu. 2023. HER2 Negative Mammary Paget's Disease or In Situ Melanoma? A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Pathol*:1101130. ISSN: 2090-679X (online), 2090-6781 (print). *Indexat BDI (Google Scholar, PubMed, Web of Science)*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37260825/>. doi:10.1155/2023/1101130
 10. **Luana-Andreea Boşoteanu**, Mariana Aşchie, Tony Hangan, Oana Andreea Ursică, Mădălina Boşoteanu. 2021. Breast Metastasis of a Completely Regressed Cutaneous Melanoma – Case Report and Review of Literature. *ARS Medica Tomitana*;1(27):36-42. ISSN: 1223-9666 (print), 1841-4036 (online). *Indexat BDI (Google Scholar)*. <https://sciendo.com/article/10.2478/ar-sm-2021-0008>. doi:10.2478/ar-sm-2021-0008