

BIOMARKERI PENTRU APRECIEREA PROGNOSTICULUI ÎN MELANOMUL MALIGN (Partea I)

BIOMARKERS FOR PROGNOSTIC ASSESMENT IN MALIGNANT MELANOMA (Part I)

M. ALECU*,**, GABRIELA COMAN*, ANDREIA OANA COMAN, IONICA COSTACHE
RĂDULESCU**, MARIA ILINCA***, ROXANA DUMITRESCU*, MARIA GRIGORE*, ALINA
MUȘETESCU*

București

Rezumat

Evoluția imprevizibilă a melanomului malign a impus găsirea unor factori cu valoare de biomarkeri care să fie corelați foarte bine cu evoluția procesului tumoral., pentru aprecierea prognosticului acestei afecțiuni. Pe parcursul ultimilor decenii s-au luat în considerație numeroși biomarkeri, respectiv structuri biologice măsurabile pe baza cărora se apreciază cel puțin două aspecte din evoluția melanomului malign: durata de timp până la apariția metastazelor, durata medie de viață.

În studiul nostru ne-am propus evaluarea acestor biomarkeri utilizați în prezent de la fiecare nivel de expresie urmărindu-se corelația care există între prezența acestor markeri și evoluția procesului tumoral, cu stabilirea valorii prognostice pentru fiecare biomarker prezentat.

Prezentând aceste date studiul nostru urmărește stabilirea valorii prognostice a acestor factori de utilitate clinică imediată dar și în perspectiva apariției unor noi terapii imunologice sau genetice în melanomul malign.

***Cuvinte cheie:** melanom, biomarker, prognostic.*

Summary

The unpredictable evolution of malignant melanoma made necessary the finding of factors with biomarker value, well correlated with tumor evolution process, for prognostic assessment of the disease. In the latest decades numerous biomarkers were considered respectively, biologically measurable structures, on the basis of which at least two aspects were assessed for malignant melanoma evolution: period of time till metastases occurrence, medium life span.

In our study we aimed evaluation of these markers starting with their level of expression : clinical level, histological level, immunohistological level, serological level and the genetic one.

There are presented the main biomarkers used, at present, for each level of expression, considering the correlation between these markers presence and tumor process evolution, establishing the prognostic value for each presented marker.

Our study aims to follow up the prognostic value assessment of these factors, of clinic close utility but also in the perspective of a new immunological or genetical therapies in malignant melanoma.

***Key words:** melanoma, biomarker, prognostic.*

DermatoVenerol. (Buc.), 57: 155-168

* Spitalul Clinic de boli infecțioase și tropicale Victor Babeș, Clinica de Dermatologie, București.

Clinical Hospital for Infectious and Tropical Diseases Victor Babeș, Dermatology, Bucharest

** Universitatea Titu Maiorescu, Facultatea de Medicină, Dermatologie, București.

Titu Maiorescu University, Medicine Faculty, Dermatology, Bucharest

*** Academia Tehnică Militară, Laborator Biochimie, București.

Military Academy, Biochemical Department

În sens larg biomarkerii sunt o serie de factori care apar în cursul dezvoltării unui proces patologic și sunt corelați cu evoluția acestui proces.

În cazul biomarkerilor tumorali, acești factori reprezintă structuri biologice măsurabile care sunt corelate cu prezența și progresia procesului tumoral. Aceste structuri biologice, în marea majoritate a cazurilor proteine, pot aparține atât tumorii cât și organismului gazdă [1].

Structurilor biologice apărute în cursul proliferării tumorale li se poate acorda o anumită valoare care poate avea valoare diagnostică (certifică existența procesului tumoral), de prognostic (evolutiv sau chiar vital) sau aceeași biomarkeri pot avea chiar ambele tipuri de valori.

În cele mai multe cazuri valoarea care se acordă biomarkerilor este relativă existând puține cazuri când aceștia reprezintă o ceritudine.

În cazul proceselor tumorale unde diagnosticul de ceritudine este dat în marea majoritate a cazurilor de examenul histopatologic clasic, biomarkerii au rol în aprecierea prognosticului. Elementele de diagnostic în histologia clasică pot fi însă uneori apreciate ca „biomarkeri”. În schimb o serie de elemente care evidențiază apartenența unei tumori la un anumit țesut pot fi încadrate ca biomarkeri. Ca o observație generală în cazul afecțiunilor ne-tumorale, biomarkerii sunt corelați cu evoluția bolii, mai rar cu prognosticul vital în timp ce în cazul proceselor tumorale biomarkerii sunt corelați în special cu prognosticul vital. În cazul ambelor tipuri de afecțiuni biomarkerii sunt utilizați și ca element de apreciere a efectului terapeutic.

În melanomul malign se respectă aceste reguli generale dar utilizarea biomarkerilor se referă în special la aprecierea intervalului de la diagnostic la apariția metastazelor ganglionare sau tisulare. Se consideră că depistarea precoce a acestor metastaze și intervenția asupra lor ar crește semnificativ durata de viață a pacienților [1,2].

Melanomul malign este o tumoră în care relația gazdă tumoraă este deosebit de importantă. Este cunoscut faptul că scăderea imunității gazdei se suprapune în multe cazuri cu momentul apariției metastazelor. De asemenea modelele de progresie tumorală, care presupun

In a broad sense, biomarkers are a number of factors that occur in the course of development of a pathologic process being correlated with the evolution of this process.

Tumoral biomarkers represent measurable biological structures correlated with the presence and progression of the tumoral process. These biologic structures, mainly proteins, may belong to the tumor or the host organism [1].

Biological structures appeared in the course of tumoral proliferation may receive a diagnostic value (certifying the presence of the tumoral process), a prognostic value (evolution or vital) or the same biomarkers may have both of these values.

In most cases the biomarkers given value is relative, only in a few cases representing a certainty. In the tumoral processes in which the majority of cases, classical histopathological examination offers the certainty diagnosis, the biomarkers are important in prognostic assessment. Some elements from classical histology may be appreciated as biomarkers. Instead, a series of elements that emphasize a tumor origin from a particular tissue may be classified as biomarkers.

As a general remark in non tumoral diseases, biomarkers are correlated with the disease evolution, rarely being related by vital prognostic, while in tumoral processes biomarkers are specially correlated with vital prognostic. In both disease types biomarkers are used as therapeutical effect assessment.

In malignant melanoma these general rules are respected but the biomarkers use regards specially the period of time from diagnosis to tissue or lymph node metastases occurrence. It is believed that early detection of these metastases and their removal significantly increases the patient's lifespan [1, 2].

Malignant melanoma is a tumor in which the host tumor relationship is very important. It is well known that decrease of host immunity overlaps in most of the cases the time of metastases emergence. Also, the tumoral progression patterns presuming that initiation of

că inițierea proliferării tumorale are loc la nivelul celulei stem melanocitare din regiunea nișei consideră că aceste celule suferă în cursul migrării spre epiteliu acțiunea a numeroși factori ambientali tisulari care accentuează evoluția malignă a celulelor stem melanocitare și diferențierea lor în mai multe subpopulații cu agresivitate și rezistență la terapie diferite [3]. Acest fapt reprezintă unul dintre motivele care fac ca în aprecierea evoluției melanomului malign să fie luați în considerare nu numai markerii legați de tumoră dar și cei legați de organismul gazdă.

În multe cazuri biomarkerii tumorali legați de microambientul tisular dar și la nivelul epitelului pot evidenția indirect fenomenul de „scăpare” a tumorii de mecanismele citotoxice antitumorale fiziologice pe care le posedă organismul uman.

Mortalitatea mare care există în melanom, precum și evoluția imprevizibilă a făcut ca să se ia în considerare numeroși biomarkeri care în cele mai multe cazuri încercau anticiparea evoluției procesului tumoral și nu neapărat prognosticul vital.

Aprecierea pe care o dau acești biomarkeri este o apreciere statistică, respectiv un procent obținut utilizând ca studiu un număr mare de pacienți care prezintă un anumit biomarker. Predicția pe care o oferă un biomarker nu poate aprecia ce anume se întâmplă cu un anumit pacient care exprimă acest biomarker.

În aprecierea valorii de predicție a biomarkerilor trebuie să se țină seama că în cele mai multe cazuri acești biomarkeri sunt structuri biologice legate de procesul tumoral care pot avea o exprimare variabilă în timp. Absența unui biomarker la momentul investigării nu înseamnă că acest biomarker nu a fost prezent. Mai mult, există biomarkeri (un exemplu fiind c-kit) care uneori nu se evidențiază ca proteină transmembranală dar este prezent în celulă fiind totuși transcris.

Există în prezent numeroși markeri utilizați pentru a aprecia evoluția melanomului malign, respectiv durata de timp până la apariția metastazelor și indirect prognosticul vital. În ultimii ani, în special prin biomarkeri genetici se încearcă o apreciere a prognosticului și după apariția metastazelor.

tumoral proliferation takes place in bulge region melanocyte stem cells, consider that these cells are exposed to numerous tissue environmental factors in their migration to epithelium factors that elicit malign evolution of melanocyte stem cells and their differentiation in subpopulations with different aggressiveness and therapy resistance [3].

This represents a motive in considering both tumor and host linked markers in malignant melanoma evolution assessment.

In many cases tumoral markers in connection with tissue microenvironment but also with epithelium level may indirectly emphasize the escape of the tumor from antitumoral physiologic cytotoxic mechanisms of the human organism.

The high rate of mortality in malignant melanoma and the unpredictable evolution has made to take into account numerous biomarkers which in most cases were trying to anticipate tumoral evolution not necessarily the vital prognosis. The appreciation given by these markers is a statistical one respectively a percent resulted from studying a great lot of patients that present this biomarker. Predictability offered by a biomarker may not appreciate what will happen with a patient that has this biomarker.

Appreciation of predictability value of a biomarker may take into account their variable expression in time, considering their biological structures linked to the tumoral process. The absence of a given biomarker at a time does not mean that it was not present before. Furthermore there are biomarkers that sometimes are not emphasized as transmembranal protein but are present within the cell being transcript.

Nowadays numerous markers are used to appreciate the malignant melanoma evolution respectively the period of time till metastases occurrence and vital prognostic indirectly. In recent years it tries, especially genetic markers, to appreciate prognostic even after metastases occurrence. The existence of numerous markers requires systematization depending on their level of expression. Thus we consider that

Existența a numeroși biomarkeri necesită o sistematizare a lor în funcție de nivelul de exprimare a acestora. Astfel, considerăm că există biomarkeri la nivel clinic, histologic, imunohistologic, seric și genetic.

Nivelul clinic

Biomarkerii prezenți la nivelul clinic sunt exprimați fie la nivelul gazdei fie al tumorii. Legați de gazdă sunt markerii bine cunoscuți ca: vîrstă (prognostic mai prost la vîrstă mai înaintată), sexul (bărbații au un prognostic mai prost), localizarea anatomică (capul, gâtul, palmele, plantele, au un prognostic mai prost). Deficitul imun datorat altor afecțiuni asociate (hepatice, renale, diabet) pare să înrăutățească prognosticul [4,5].

Legat de tumoră, următoarele caracteristici înrăutățesc prognosticul: forma clinică, volumul tumoral, prezența ulcerăției sau a sîngerării, regresia recurentă locală. Absența fazei de creștere radiale, cum este cazul melanomului nodular, sau a melanomului dezvoltat pe mucoase, face ca prognosticul să fie mult mai prost. Melanomul acral are un prognostic mai prost datorită diagnosticării târzii.

Nivelul histologic

În cazul melanomului ca și în alte tumori solide metodele histologice clasice care identifică celulele tumorale reprezintă principalul mijloc de diagnostic al unui proces tumoral. O serie de parametri care nu sunt utilizați direct pentru diagnosticul histologic pot fi utilizați ca biomarkeri pentru stabilirea modului de evoluție a tumorii și implicit a prognosticului funcțional sau vital. Astfel, în cursul melanomului malign s-au luat în considerație: nivelul de invazie Clark, grosimea tumorii, indicele mitotic, prezența ulcerăției, nu numai la nivel clinic dar și histologic.

Nivelul de invazie Clark. Aprecierea nivelului de invazie Clark are la bază observația că progresia tumorală în cazul majorității formelor clinice de melanom se face în trei etape:

- proliferarea melanocitelor tumorale se face numai la nivelul epidermului fără să depășească membrana bazală (melanom in situ). Această fază numită fază de creștere

there are biomarkers at clinical level. Histological, immunohistological, serological and genetic.

Clinical level

Biomarkers present at this type of level are expressed at host level or tumor level. Host linked well known biomarkers are: age (poor prognostic in elderly patients), sex (men have poorer prognostic), anatomic localization (head, neck, palms and plants have poorer prognostic). Immune deficiency due to some other associated diseases (liver, kidney, diabetes) seems to worsen the prognostic [4,5]

Tumor linked markers the following characteristics are worsening the prognostic: clinical form, tumoral volume, ulceration presence or bleeding, local recurrent regression. The absence of the radial increase phase, as in nodular melanoma, or mucosal melanoma development makes the prognostic poorer. Acral melanoma presents a poorer prognostic, generally due to its late diagnosis.

Histological level

In melanoma case, as in other solid tumors, classical histological methods represent the main diagnosis way of tumoral process identification. Some of the parameters not directly used in histological diagnosis may be used as biomarkers for tumor evolution development and implicit for functional and vital prognostic. Thus in malignant melanoma development were taken into consideration: Clark level of invasion, tumor thickness, mitotic index, ulceration presence, not only at clinical level but also at histological level.

Clark level of invasion. This is based on the observation that tumor progression in the majority of melanoma clinical forms follows three steps:

- tumor melanocytes proliferation is realized only at epidermis level without exceeding basement membrane (in situ melanoma). This phase, named radial increase, has a

- radiară are o durată lungă de evoluție, ani de zile și dacă se excizează chirurgical tumora, prognosticul vital este foarte bun.
- faza microinvazivă (de fapt o subfază a celei de creștere radiale) în care există o microinvazie în derm cu formarea de microcuiburi în derm dar fără mitoze.
 - faza de creștere verticală în care celulele tumorale invadează dermul și țesutul subcutanat formând noduli și mase tumorale de celule melanice maligne cu activitate mitotică intensă. Intrarea în faza de creștere radiară corespunde unei creșteri accentuate a capacității de metzastazare [5].

Clasificarea Clark, foarte utilizată în prezent, stabilește cinci nivele anatomice de prezență (invazie) a celulelor tumorale: nivelul I (Clark I) prezența celulelor tumorale în epiderm, nivel II (Clark II) –prezența celulelor tumorale în număr redus la nivelul papilelor dermice, nivel III (Clark III) celule tumorale se găsesc în număr mare în dermul papilar și iau contacte cu dermul reticular, nivel IV (Clark IV) celulele tumorale sunt prezente în dermul reticular, nivelul V (Clark V) în care celulele tumorale sunt prezente în dermul reticular și țesutul subcutanat [5].

În prezent este obligatoriu ca un buletin histopatologic în care se stabilește diagnosticul de melanom malign să prezinte și nivelul de invazie Clark. Cu toate acestea valoarea prognostică a clasificării Clark este relativ grosieră.

Indicele Breslow. Utilizat prima oară de către Alexander Breslow în 1970 acest indice măsoară grosimea tumorii și se calculează cu o linie verticală dreaptă de la stratul granular la cel mai profund punct al masei tumorale [6]. Observațiile clinice au arătat că acest indice, care trebuie specificat obligatoriu în buletinul histopatologic este mai bine corelat cu evoluția tumorală. Astfel un indice mai mic de 1 mm a fost corelat cu o supraviețuire la 10 ani, de 92% pe un lot de 11841 de pacienți cu melanom malign. Un lot de 2461 pacienți cu un indice Breslow de 4 mm a prezentat o supraviețuire la 10 ani de 50%. Există numeroase tabele în care se arată valoarea prognostică a acestui indice [7]. Tendința este de a acorda valoare prognostică mai mare acestui index decât nivelului de invazie Clark.

long evolution (years) and if the tumor is excised the vital prognostic is very good.

- micro invasive phase (in fact a subphase of radial increase) with a dermal micro invasion with micro nests formation in derma without mitoses.
- Vertical increase phase in which tumoral cells invade derma and subcutaneous tissue forming nodules tumoral masses of malignant melanocytes with intense mitotic activity. Entrance in the radial increase phase correspond to elicited capacity of metastasizing [5].

Clark classification, intensely use nowadays establishes five tumoral cells anatomic levels of invasion: level I (Clark I) tumor cells present in epidermis , level II, (Clark II) tumor cells present in small number in papillary dermis , level III (Clark III) numerous tumoral cells in papillary dermis, in contact with reticular dermis, level V (Clark V) tumoral cells are present in reticular dermis. and subcutaneous tissue [5].

At present, it is imperative for a histopathological bulletin that establishes malignant melanoma diagnosis to mention Clark invasion classification. Nevertheless prognostic value of Clark classification is relatively coarse.

Breslow index. Used for the first time by Alexander Breslow in 1970 this index measures the tumor thickness calculated as a vertical traced from granular stratum to the most profound tumoral mass point [6]. Clinical observations showed that this index is better correlated with tumor evolution. So an index lower than 1 mm was correlated with a survival at 10 years in 92% in a lot of 11,841 malignant melanoma patients. In a lot of 2,461 patients with Breslow index of 4 mm the survival rate at 10 years was of 50%. There are lot of tables with the prognostic value of this index [7].

Tendency is to value more the Breslow index than the Clark level of invasion.

Biological, Breslow index may be associated with adhesiveness loss by E-cadherin in melanocytes and with the expression of N-

Biologic, indicele Breslow poate fi asociat cu pierderea adezivității prin E-cadherină a celulelor tumorale melanice și cu exprimarea de N-cadherină față de E-cadherină pe suprafața melanocitelor tumorale [8].

Indicele mitotic. Acest indice se definește ca numărul de mitoze apreciate prin microscopia optică pe cm^2 . Este bine ca acest indice să fie cât mai mic, chiar zero, dar se apreciază că indicele mitotic peste 6 orientează pentru un prognostic prost. Valoarea indicelui mitotic este mai mare în cazul melanoamelor cu indice Breslow 1 mm sau nu mai mare de 4 mm [15]. La 10 ani de la debut există o recurență de 1,8% în cazurile când indicele mitotic este zero și de 19,9% când indicele mitotic este 1 (o singură mitoză evidențiată pe 1 cm^2). Se consideră că dacă indicele mitotic este zero nu există celule tumorale în ganglionul sentinelă [9]. Tendința actuală este de a considera indicele mitotic un factor important de prognostic cu valoare apropiată de indicele Breslow. Se consideră că printre numeroasele gene ce contribuie la progresia melanomului malign, genele legate de repararea ADN-ului au un rol important. Un exemplu ar fi genele Mcm^2 , Mcm^4 , Mcm^6 . Supraexpresia genelor implicate în repararea ADN (pusă în evidență indirect prin numărul de mitoze) este asociată cu metastazarea și un prognostic prost [10].

Ulcerarea. Ulcerarea în melanom nu este interpretată neapărat ca o lipsă de substanță a tumorii ci ca o întrerupere a suprafeței epitelului prin masa de celule tumorale, care poate fi evidențiată clinic sau numai histologic. În acest caz indicele Breslow se măsoară de la baza ulcerării până la cea mai adâncă parte a tumorii [6]. Prezența ulcerării pare să fie un important factor prognostic în melanomul malign fiind asociată cu un prognostic prost. Nu se știe care este explicația biologică a acestui fapt. Se presupune că existența ulcerării ar modifica ambientul peritumoral favorizând acțiunea unor factori proliferativi, sau ar fi asociată cu un defect la nivelul Thelper [10]. Se poate spune că prezența ulcerării modulează interpretarea prognostică a indicelui Breslow. Astfel, supraviețuirea la 5 ani a pacienților cu indice Breslow de 2-4 mm dar fără ulcerare a fost de 71% în timp ce pacienții cu același indice dar cu ulcerare au supraviețuit în procent de 68% [10]. Există și opinii contrare care neagă

cadherin rather than E-cadherin on tumoral melanocytes [8].

Mitotic index. Is defined by the number of mitoses optical microscopy determined on 1 cm^2 . It is better for this index to be smaller, even zero, but is appreciated that an index over 6 generates a poor prognostic.

The value of mitotic index in melanomas with Breslow index of 1mm or less than 4 mm [15].

At 10 years from debut there is a relapse of 1,8% in the cases with zero mitotic index and of 19,9 % when mitotic index is 1 (one mitosis on 1 cm^2). It is considered that if mitotic index is zero there are no tumor cells in sentinel lymph node [9].

Actual tendency is to consider mitotic index an important prognostic factor with almost the same value as Breslow index. It is considered that among multiple genes that contribute to melanoma progression of great importance are the DNA repair genes. Some examples are: Mcm^2 genes, Mcm^4 , Mcm^6 . Over expression of DNA repair genes (emphasized indirectly by mitoses number) is associated with metastasis occurrence and poor prognostic [10].

Ulceration. Ulceration is not interpreted in melanoma as a lack of substance in tumor but as a disruption of epithelium surface by the tumoral cell mass that may be clinically or only histologically evidenced. In this case Breslow index is measured from the ulceration basis to the deepest part of the tumor [6].

The ulceration presence seems to be an important prognostic factor in malignant melanoma being associated with a poor prognostic. The biological explanation of this fact is unknown. It is presumed that ulceration may change peritumoral environment favoring the proliferative factors action or being associated with T helper deficiency [10]. It may be said that ulceration presence modulates prognostic interpretation of Breslow index. So, Five years survival of patients with Breslow index of 2-4 mm, without ulceration was of 71% meanwhile patients with the same index and ulceration present a survival of 68% [10]. There are diffe-

importanța ulcerăției ca factor de prognostic în melanomul malign.

Microsateliți (microscopic satellites). Sunt mici aglomerări de melanocite tumorale situate în derm lângă masa tumorală principală, și bine individualizate de aceasta, care apar în faza de creștere verticală. Prezența lor în preparatele histologice este asociată cu un prognostic prost respectiv cu scurtarea intervalului până la apariția metastazelor [5].

Invasia vasculară. Se definește ca prezența celulelor tumorale sau a grupelor de celule tumorale în jurul vaselor. Fără să aibă o importanță deosebită se consideră ca un semn de prognostic prost [5].

Regresia. Regresia din punct de vedere histologic se definește prin scăderea numărului de melanocite tumorale de la nivelul unei tumori melnocitare. Are loc o fibroză și apar câteva celule inflamatorii și melanofage. În general regresia totală ca și regresia parțială este asociată cu o capacitate de metastazare crescută. Se consideră că o regresie de 75% din volumul tumoral este asociată cu metastazarea [11].

Infiltratul tumoral limfocitar (tumor infiltrating lymphocytes – TIL). Acest infiltrat este format în special din limfocite T citotoxice, celule NK și celule LAK, fiind considerat ca un răspuns imunologic al gazdei împotriva tumorii. Este foarte important faptul că TIL se poate evidenția ca infiltrat difuz intratumoral (activat cu contact direct celulă tumorală limfocit) sau ca infiltrat intratumoral dispus în cuiburi (non brisk) fără contact direct celulă tumorală-limfocit. Altfel spus infiltratul tumoral limfocitar se poate defini ca o bandă continuă de limfocite care pornește de la baza tumorii către interiorul acesteia.

În aprecierea infiltratului există trei posibilități: absent (non brisk), activat (brisk) și prezent neactivat. Infiltratul de tip brisk a fost observat în 21,2% din cazurile de melanom [10,12]. Absența contactului poate să fie considerată ca TIL absent. Există numeroase studii care consideră că prezența TIL în faza de creștere verticală este asociată cu un prognostic bun dar și studii care consideră că nu există nicio relație [10,12]. Într-un studiu care a utilizat 515 pacienți cu melanom malign (Breslow <1mm) efectuat de Burton A și colaboratorii [13], acesta a evidențiat

rent opinions that deny ulceration importance as a prognostic factor in malignant melanoma.

Microscopic satellites. Are small groups of tumoral melanocytes situated in dermis beside the main tumoral mass well individualized from this mass that occur in the phase of vertical growth. Their presence in histological samples is associated with a poor prognostic, respectively with a shorter time till metastases occurrence [5].

Vascular invasion. Is defined by tumoral cells or groups of tumoral cells surrounding vessels.. Without being of great importance is considered to be a poor prognostic sign. [5].

Regression. From the histological point of view regression is defined by tumor melanocytes number decrease in a melanocyte tumor level. There is a fibrosis and some inflammatory cells and melanophages occur. Generally speaking, total or partial regression is associated with an increased metastasation capacity. It is considered that a regression of 75% from the tumoral volume is associated with metastasis[11].

Tumor infiltrating lymphocytes-TIL. This contains specially T cytotoxic lymphocytes, NK cells and LAK being considered as host immune response against the tumor. It is very important that TIL may be emphasized as diffuse intratumoral infiltrate (activated by direct contact between tumor cell and lymphocyte) or by intratumoral infiltrate dispose in nests (non brisk) without direct contact tumor cell-lymphocyte. Other ways TIL may be defined as a continuous lymphocytes strip from the tumoral basis to its interior.

In TIL appreciation there are 3 possibilities :absent (non brisk), activated (brisk) and present, non activated. Brisk infiltrate was determined in 21,2% melanoma cases [10,12]. The absence of contact may be considered as TIL absent. There are numerous studies that consider TIL presence in the vertical increase phase a good prognostic factor meanwhile there are studies that consider that there is no relationship between these parameters [10,12].In a study of 515 malignant melanoma patients (Breslow < 1mm) Burton and collaborators [13] showed a 91% survival rate

că pacienții cu TIL brisk, care au avut 5 ani de supraviețuire fără metastaze au fost în procent de 91% comparativ cu pacienții non brisk care au fost în procent de 86%. Alte studii asociază absența TIL cu apariția metastazelor limfactice [14].

Stadializarea TNM. Stadializarea T (tumoră), N (adenopatie /lymph node) M (metastază) este o clasificare recomandată de OMS, foarte mult utilizată în clinică, în special în cazul tumorilor solide. Stadializarea are la bază trei factori: caracteristici tumorale, prezența sau absența adenopatiei, și prezența sau absența metastazelor la distanță [5].

În cazul factorului T (tumoră) acesta este asociat cu o serie de caracteristici cum ar fi: grosimea tumorii (indicele Breslow exprimat în mm), nivelul Clark. Cel mai important este indicele Breslow care este apreciat în următoarele categorii: <1mm, 1-2 mm, > 4mm. În cazul N (adenopatie ganglionară regională) se apreciază absența N0, sau prezența (N1) dacă este metastază sau sunt mai multe, dacă sunt micro sau macro metastaze, sau metastaze în tranzit fără implicarea nodulului limfatic.

În cazul factorului M (metastază) se apreciază absența metastazelor (M0) sau prezența (M1), apariția metastazelor la nivelul pielii, la nivelul pulmonului sau alte metastaze viscerale.

În anul 2009 American Joint Committee on Cancer (AJCC) a reevaluat stadializarea melanomului malign pe baza criteriilor TNM elaborate în 2002, utilizând date retrospective de la 30.946 de pacienți cu melanom în stadiile I, II, III, IV. Clasificarea TNM existentă pentru melanom a fost menționată, s-au păstrat criteriile generale dar și ele sunt utilizate în substadializarea criteriilor generale TNM cum ar fi: indicele Breslow, ulcerația, indicele mitotic, metastazele satelit, criteriile de atestare a metastazelor ganglionare, numărul de metastaze ganglionare, metastazele pulmonare etc. Ceea ce a adus nou versiunea din 2009 a fost o nuanțare și clarificare a criteriilor pentru substadializarea categoriilor TNM și acordarea unei importanțe mult mai mari creșterii nivelului seric al LDH în special în stadiile cu metastaze limfactice și în special ale organelor interne. Pe baza clasificării TNM se menține și stadializarea clinică a melanomului malign în care stadiul I și II reprezintă melanomul malign localizat; stadiul III

without metastases, at 5 years, in patients with TIL brisk in comparison with non brisk patients in which the survival rate was of 86%. Other studies associate TIL absence with lymph node metastases [14].

TNM stadia. This classification T (tumor), N (lymph node adenopathy) M (metastase) is WHO recommended, broadly used in clinic specially in solid tumor case. This is based on 3 factors: tumor characteristics, presence or absence of adenopathy and presence or absence of metastases [5].

Factor T. This is associated with a series of characteristics as: tumor thickness (Breslow index in mm), Clark level. The most important is Breslow index appreciated as: <1mm, 1-2 mm, > 4 mm.

N factor (regional lymph node adenopathy) absence (N0) or presence (N1) are appreciated if there are metastases, micro or macro metastases, or in transit metastases that involve the lymph node.

Factor M (metastase) consider the absence (M0) or presence (M1) occurrence of metastases at the skin level, lungs or other visceral metastases.

In 2009 American Joint Committee on Cancer (AJCC) reevaluated the stadia of malignant melanoma on TNM criteria bases from 2002 using retrospective studies on 30,946 patients with malignant melanoma stadia: I,II,III,IV. TNM classification was mentioned, general criteria were preserved but they were used in substadialisation of general criteria TNM such as: Breslow index, ulceration, mitotic index, satellite metastases, lymph node validation criteria, number of lymph node metastases, lung metastases etc. The novelty of the 2009 version was in clarification and improvement of criteria for substadia categories TNM and the importance accorded to LDH serum level especially in the cases with lymph node metastases and organs metastases. In TNM classification clinic stadialisation is maintained in malignant melanoma in which stadium I and II represent localized malignant melanoma, III

melanomul cu metastaze regionale și stadiul IV melanomul cu metastaze la distanță [7].

Appreciate în mare fără substadializarea TNM, stadiul I prezintă o supraviețuire la 5 ani de aproximativ 90%; stadiul II prezintă o supraviețuire la 5 ani de între 45% și 78% ; stadiul III prezintă o supraviețuire la 5 ani de 49% iar stadiul IV prezintă o supraviețuire între 9% și 18% [5].

Nivelul imunohistochimic

Acest nivel presupune identificarea a o serie de structuri biologice cu valoare de biomarkeri prin metode imunohistochimice. Imunohistochimia reprezintă un grup de tehnici care utilizează reacția antigen anticorp și un sistem de vizualizare pentru a evidenția o serie de structuri biologice, în cele mai multe cazuri proteine, la nivel celular fără alterarea structurii celulare sau tisulare. Practic anticorpii dirijați împotriva unei proteine pe care dorim să o evidențiem sunt cuplați cu sistemul de vizualizare (fluoresceină, peroxidaze, elemente radioactive) și puși în contact direct cu structurile pe care vrem să le identificăm. Cuplarea de mare afinitate a proteinei pe care dorim să o identificăm cu un anticorp asociat cu un sistem de vizualizare va putea identifica proteina respectivă dar și locul în spațiul celular unde este localizat []

Prin intermediul imunohistochimiei se pot pune în evidență atât structuri celulare normale cât și patologice care apar în diferite procese patologice celulare inclusiv în procesul tumoral.

În cazul melanomului malign există numeroși biomarkeri care pot fi evidențiați prin metode imunohistochimice și care în prezent au devenit investigații de rutină. Dar spre deosebire de biomarkerii histologici, cei evidențiați prin metode imunohistochimice au în principal valoare în stabilirea diagnosticului în sensul stabilirii originii celulei care proliferază. Astfel markerii evidențiați prin metode imunohistochimice sunt importanți în diagnosticul diferențial histologic și au o valoare prognostică asupra evoluției tumorii, aproximativ redusă.

Dintre cei mai utilizați markeri imunohistochimici utilizați în melanom sunt: HBM45, Melan A, Proteina S100, MITF, tirozinaza, markeri mezenchimali, metaloproteinazele, receptori pentru chemokine, molecule de adeziune.

stage regional metastases and IV stage, malignant melanoma with long distance metastases [7].

Appreciated greatly without TNM, stage I presents a survival rate at 5 years of 90%, stage II a rate between 45% and 78% stage III presents a survival at 5 years of 49 % and stage IV between 9 and 18% [5].

Immunohistochemical level

This level suppose the identification of a series of biological structures with biomarker value by immunohistochemistry. This represents a group of methods that use an antigen antibody reaction with a visualization system for emphasizing biological structures, mostly proteins at the cell level, without altering the cell or tissue structure. Basically, antibodies against the target protein are bounded with the visualization system (fluoresceine, peroxidase, radioactive elements) and put into direct contact with the target structure. Coupling with high affinity between the target and the antibody associated with visualization system may identify the target and its site in the cell space [].

By immunohistochemistry normal cell structures may be determined and pathological ones occurred in different pathogen processes including tumoral process.

In malignant melanoma there are lots of biomarkers that may be determined by immunohistochemistry, at present being routinely performed. Unlike histological markers, the immunohistochemical ones are valuable in diagnosis establish the origin of the proliferating cell establishing. Immunohistochemical markers are important in histological differential diagnosis and present modest prognostic value regarding tumor evolution. Amongst immunohistochemical markers intensely used are: HBM45, MelanA, S-100 protein, MITF, tyrosinase mezenchimal markers, metalloproteinases, chemokine receptors, adhesion molecules.

HBM 45. At present, represent one of the most used marker in immunohistochemistry. Is a monoclonal antibody that reacts with a glycoprotein expressed in premelanosomes from

HBM45. Reprezintă în prezent unul dintre cei mai utilizați markeri imunohistochimici. Este un anticorp monoclonal ce reacționează cu o glicoproteină ce este prezentă în premelanozomii din citoplasma melanocitelor. Această glicoproteină de 100 gp denumită după numele anticorpilor HBM-45 este pusă în evidență pe melanocitele normale, melanocitele tumorale în proporție de 90% și este negativ în melanomul desmoplastic. Determinările HBM-45 au o sensibilitate și o specificitate foarte bună fiind însă pozitivă în nevi joncționali și schwanoame [16,17]. Are o valoare prognostică limitată.

Melan A (MART 1). Este o proteină exprimată în citoplasma melanocitelor care este recunoscută de limfocitele T citotoxice. S-a demonstrat că acest antigen este pozitiv în majoritatea cazurilor de melanom dar cu o exprimare redusă și pe leziunile nevice și este negativ în cazul melanoamelor desmoplastice. [17,18].

Are valoare prognostică limitată.

Proteina S-100. Este o proteină prezentă în citoplasma melanocitelor ca o proteină care leagă calciul (calcium binding protein). Proteina S-100 este exprimată și în celulele prezentatoare de antigen și în celulele paracortexului ganglionilor limfatici. [16,19]. Proteina S-100 este prezentă sub mai multe izoforme existând anticorpi monoclonali pentru toate aceste izoforme. În prezent determinarea acestei proteine la nivel celular este înlocuită cu determinarea nivelului seric al acestei proteine ce constituie un biomarker foarte important pentru prognosticul melanomului malign.

MITF (factorul de transcripție asociat microftalmiei). Reprezintă un factor de transcripție esențial pentru diferențierea și supraviețuirea melanocitelor dar și pentru sinteza melaninei. Acțiunea sa la nivel nuclear vizează genele antiapoptotice Bcl-2. Este prezent pe melanocitele normale și tumorale dar și pe macrofage, limfocite, fibroblaste sau celule Schwann. Este utilizat în special în diagnosticul diferențial histologic al melanomului malign având o valoare prognostică mică [16,20].

Tirozinaza. Inițial tirozinaza s-a evidențiat prin metode imunohistochimice pe melanocitele normale și tumorale având o valoare diagnostică foarte bună și o valoare prognostică limitată. În prezent prin tehnica RT-PCR s-a utilizat

melanocytes cytoplasm. This glycoprotein of 100 gp named upon HBM-45 antibodies is emphasized on normal melanocytes, tumor melanocytes in 90% and is absent in desmoplastic melanoma.

This marker has a good sensitivity and specificity but it also positive in junctional nevi and schwannomas [16,17].

Melan A (MART). Is a protein expressed in melanocyte cytoplasm recognised by T cytotoxic lymphocytes. It was demonstrate that this antigen is pozitiv in the majority of melanoma cases but is low expressed in nevi lessions and negative in desmoplastic melanoma [17,18].

It presents limited prognostic value.

S-100 protein. Is a protein present in the melanocytes cytoplasm as a calcium binding protein, S-100 protein is also expressed in antigen presenting cells and in the cells from lymph nodes paracortex [16,19].

S-100 protein has several izoforms, monoclonal antibodies existing for each of them. Nowadays cell determination of the protein is replaced with serological determination an important prognostic factor for malignant melanoma.

MITF (microphthalmia transcription factor). Represents an essential factor for melanocytes survival and differentiation but also for melanin synthesis. Its action at nuclear level regards antiapoptotic Bcl-2 genes. It is expressed on normal melanocytes and tumoral ones but low on macrophages, lymphocytes, fibroblasts or Schwann cells. It is specially used in histological differential diagnosis of malignant melanoma having a small prognostic value [16,20].

Tyrosinaze. Initially tyrosinaze was determined on normal and tumoral melanocytes by immunohistochemical methods with a very good diagnostic value but a limited prognostic value. At present, by RT-PCR tyrosinaze is determined as a biomarker for metastatic melanoma cells from the sentinel lymph node level.

Mesenchimal markers. Represent a series of cytoskeleton proteins or trans membrane proteins as vimentine, desmine, actin or CD31

determinarea tirozinazei ca biomarker pentru celulele metastatice de melanom la nivelul ganglionului santinelă.

Markerii mezenchimali. Reprezintă o serie de proteine de citoschelet sau transmembranale cum ar fi vimentina, desmina, actina sau CD31, CD34, care au valoare diagnostică dar nu au valoare prognostică.

Metalloproteinazele. Reprezintă un grup de enzime implicate în refacerea proteinelor structurale și ale membranei bazale fiind implicate în procesul de vindecare a rănilor, angiogeneză, fiind crescute în procesele de alterare tisulară. Un grup din aceste enzime, gelatinazele, (gelatinosin matrix metalloproteinases) respectiv MMP-2 și MMP-9 sunt implicate în progresia și invazia a numeroase tipuri de tumori solide inclusiv melanom. Supraexpresia de MMP-2 (peste 20% din celule pozitive) este asociată cu un prognostic prost. Într-un studiu efectuat de Vaisaen A.H. și colaboratorii - a evidențiat o rată de supraviețuire a pacienților la 10 ani de 41% la cei cu supraexpresia de MMP-2 și de 79% la cei cu MMP-2 scăzut. MMP-9 nu a avut valoare prognostică [22, 23].

Chemochinele. Sunt un grup de molecule de semnal care au o capacitate crescută de a induce chemotaxia leucocitelor fiind implicate în inflamație dar și în proliferarea tumorală, inclusiv a melanocitelor. Acțiunea chemochinelor are loc când acestea sunt cuplate cu receptorii specifici depuși pe suprafața celulelor. S-a demonstrat că receptorul pentru chemochina CXCR4 când are o exprimare crescută este asociat cu un prognostic prost în evoluția melanomului [24].

Moleculele de adeziune. Sunt importante pentru melanomul malign moleculele de adeziune încadrate în superfamilia de imunoglobuline respectiv molecule transmembranale cu structură de imunoglobuline. Dintre acestea moleculele MCAM (Mcl-CAM), MUC18 (CD146), L1 (L-1-CAM/CD171), A1-CAM (CD166), ICAM1 și CEACAM1 (moleculă asemănătoare antigenului carcinoembrionar) sunt cele mai importante. Creșterea expresiei MCAM, Li-CAM este asociată cu un prognostic prost al melanomului malign [25].

Factorii KBA62 și PNL2. Reprezintă doi anticorpi monoclonali care reacționează cu

CD34 with diagnostic value but without prognostic value.

Metalloproteinase. Represents a group of enzymes involved in structural protein reconstruction and basal membrane involved in wound healing, angiogenesis being increased in tissue damage processes. One group of these enzymes, gelatinases (gelatinosin matrix metalloproteinases) respectively MMP-2 and MMKP-9 are involved in the progression and invasiveness of different solid tumor types including malignant melanoma. Over expression of MMP-2 (over 20% of the cells positive) is associated with a poor prognostic. In Vaisaen and collaborators study showed a survival rate at 10 years of 41% in over expressed MMP-2 patients and of 79% in those with decreased MMP-2. MMP-9 presented no prognostic value [22,23].

Chemokines. Are a group of signaling molecules with increased capacity of inducing lymphocytes chemo taxis being involved in inflammation but also in tumor proliferation, including in melanocytes. Their action take place when their coupled with their specific receptors from the cell surface. It was demonstrated that the receptor for CXCR4 chemokine when is elevated is associated with a poor prognosis in malignant melanoma[24].

Adhesion molecules. For malignant melanoma adhesion molecules from immunoglobulin superfamily are important respectively transmembrane molecules with immunoglobulin structure. Among these, the most important are: MCAM (Mcl-CAM), MUC18 (CD146), L1 (L-1-CAM/CD171), A1-CAM (CD166), ICAM1 and CEACAM1 (molecule similar to carcino embrionar antigen). Increased expression of MCAM, Li-CAM is associated with poor prognostic for malignant melanoma [25].

KBA62 and PNL2 factors. Represents monoclonal antibodies that interacts with proteins expressed on normal and tumoral melanocytes. They are present in benign nevi, gastro intestinal mucosal melanoma in desmoplastic melanoma and in melanoma metastases. Their prognostic value is limited [26].

proteinele exprimate de melanocitele normale și tumorale. Se întâlnesc în nevi benigni, în melanomul mucoasei gastrointestinale în melanomul desmoplastic ca și în metastazele de melanom. Valoarea prognostică este limitată [26].

Receptorul c-kit. Este o proteină trans-membranală care aparține superfamiliei de receptori pentru proteinkinază fiind exprimat pe mai multe tipuri de celule normale și tumorale inclusiv pe melanocite. Ligandul său specific este SCF (stem cell factor) prin cuplare cu c-kit activează fosfatidil inositol 3 kinaza ca și alte tipuri de enzime, fosfolipaze, familia src, calea ras-erk.

Receptorul c-kit este implicat major în migrarea melanocitelor netumorale, proliferarea și supraviețuirea melanocitelor. În funcție de factorii din microambientul peritumoral, respectiv factorul bazic de creștere al fibroblastelor (FGFβ), C-kit poate acționa ca factor de supraviețuire (FGFβ/absent), factor de proliferare pentru melanocite (FGFβ/prezent), sau fără niciun efect asupra melanocitelor (FGFβ crescut). Melanocitele tumorale exprimă c-kit într-o proporție foarte variabilă între 20% și 80%. Se consideră în general că prezența c-kit pe melanocite ar indica un prognostic prost, mai ales că melanocitele tumorale cu c-kit prezent sunt mai rezistente la factori terapeutici. Cu toate acestea, în metastazele de melanom c-kit are o exprimare redusă [27,28].

S-a demonstrat că c-kit este exprimat și la nivelul celulelor stem melanocitare dar și la nivelul unor subpopulații de celule tumorale (melanoma initiating cell) care inițiază și mențin proliferarea tumorală [29].

Discuții / Concluzii

Prezentarea grupată a celor trei categorii de factori cu valoare de biomarkeri pentru stabilirea prognosticului nu este întâmplătoare. Aceste trei nivele: clinic, histologic și imunohistochimic prezintă biomarkerii legați de tumoră care fixează cadrul general al evoluției procesului tumoral și care nu mai pot fi modificați prin mijloace terapeutice. Practic nu se poate interveni asupra lor. Totodată prezentarea lor se face în ordine cronologică atât în ceea ce privește folosirea lor ca biomarkeri ca și în ordine firească de investigație a unui pacient care se presupune că prezintă un proces tumoral melanocitar. Sunt

C-kit receptor . Is a transmembrane protein, part of the protein kinase receptor superfamily expressed on numerous normal and tumoral cell types, including melanocytes. Its specific ligand is SCF (stem cell factor). C-kit- SCF coupling activates phosphatidil inositol 3 kinase and some other enzyme types as: phospholipase, src family, ras-erk pathway. C-kit receptor is involved in non tumoral melanocytes migration proliferation and survival. According to environmental peritumoral factors, respectively FGFβ (basic fibroblasts growth factor) , c-kit may act as a survival factor (FGFβ absent), or without an effect on melanocytes (FGFβ increased). Tumor melanocytes expresses c-kit in a variable proportion, between 20% and 80%. It is considered that c-kit expressing on melanocytes is a poor prognostic factor, specially because these melanocytes are resistant to therapeutical factors. However , in melanoma metastases c-kit is poorly expressed .

It was demonstrated that c-kit is expressed on stem melanocyte cells but also on tumor cells sup populations level (melanoma initiating cells) that initiate and maintain tumor proliferation[29].

Discussions/Conclusions

Grouped presentation of these three categories of biomarkers for prognostic establishing is not random. These three levels, clinical, histological and immunohistochemical are presenting tumoral correlated biomarkers that establish the background of tumor evolution process and that may not be changed by therapy. Practically, they may not be influenced. In the same time their presentation is chronologically realized regarding their biomarker utilization or as a natural investigative follow up for a patients with a melanocyte tumor process.

There are also biomarkers used in malignant melanoma prognostic for 30-40 years, lot of studies trying to reveal their prognostic value as biomarkers. Moreover there are studies as REMARK that offers a guide for prognostic value of biomarkers future establishing. In this study, is underlined, y adequate statistical methods, the

totodată biomarkeri care se utilizează în prognosticul melanomului malign de 30-40 de ani și există numeroase studii care încearcă să evedențieze valoare prognostică a acestor biomarkeri. Mai mult, există studii cum ar fi studiul REMARK care oferă un ghid de efectuare a studiilor pentru stabilirea valorii prognostice a unui biomarker. În acest studiu se insistă pentru evedențierea și exprimarea prin mijloace statistice adecvate asupra relației care există între biomarkeri și variabile de prognostic, în cazul melanomului, timpul până la apariția metastazelor și durata de supraviețuire. Mai nou, odată cu progresul și succesele terapeutice antitumorale în melanom se încearcă corelarea biomarkerilor cunoscuți cu răspunsul la tratament și indirect cu durata de supraviețuire [15].

Spre deosebire de celelalte categorii de biomarkeri, biomarkerii din nivelul clinic histopatologic și într-o oarecare măsură și biomarkerii din nivelul imunohistochimic răspund mai greu la această cerință.

Cu toate acestea, biomarkerii utilizați la aceste trei nivele sunt deja utilizați de rutină, valoarea lor prognostică fiind relativ bine cunoscută fără însă să fie absolută.

Primit în redacție în 15 martie 2012

Acceptat în 20 aprilie 2012

Conflict de interese nedeclarate.

relationship between biomarkers and prognostic variables in melanoma, the time till metastases occurrence and the survival rate.

Concomitantly with progression and antitumoral therapeutical, successes in melanoma there is the tendency of correlating the known biomarkers with therapeutic response and indirectly with survival rate [15].

Unlike other categories of biomarkers, clinical, histological and partially immunohistochemical ones, are less correlated with this parameters. However these three levels used biomarkers are routinely performed their prognostic value being known without being absolute.

Received in redaction at 15th march,

accepted in 20th April 2012

There are no declared conflict of interest.

Bibliografie/Bibliography

1. Gogas H, Eggermont A.N.M, Hauschild A. et all - Biomarkers in melanoma, *Annals of Oncology* 2009, (supplement) VI 8-VI13
2. Singh H, Sethi M., Petersen L.A- Error in cancer diagnosis : current understanding and future direction. *J.Clin.Oncol.* 2007, 25, 5009-5018
3. Rafaeli Y., Bhoumik A., D.R. Roop., Ronai Z.A.- Melanoma-initiating cells: a compass needed *EMBO*, 2009, 10, 965-972
4. Zattra Z., Fortina A.B., Bordignon M., et al. - Immunosuppression and melanocyte proliferation . *Melanoma RFG* 2009, 19(2), 63-68
5. Melanoma molecular maps projects. *Melanoma research* 2008, vol. 18 (3), 163-165, <http://wwwmmmp.org/immmp/welcome/map>
6. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognostic of cutaneous melanoma. *Ann.Surg.* 1970, 172, (5), 902-908
7. Blach C., Gerschenvald J.E., Song S.J. – Final version of 2009 ASJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol.* 22009, 27(36), 6199-6206
8. Kreizenbeck N.G., Berger A.J., Subtil A. et al. – Prognostic significance of cadherin-based adhesion molecule in cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidermal Biomarker Rev.* 2008, 17(4), 949-958
9. Kesmodel S.B., Karacousis G.C., Botbyl J.D. –Mitotic rate as a predictor of sentynel lymph node positivity in patients with thin melanoma. *Ann.Surg.Oncol.* 2005, 12(6), 449-458

10. Spatz A., Stock N., Balist G., Kempen L.C. – The biology of melanoma prognostic factors. *Discovery Medicine* 2010.
11. Byers H.R., Bahwan J. – Pathologic parameters in the diagnosis and prognosis of primary cutaneous melanoma. *Hematol.Oncol.Clin. North Am.* 1998, 12(4), 717-725
12. Spatz A., Gymoti P.A., Cook M.O. – Protective effect of brisk tumor infiltrating lymphocyte infiltrate in melanoma an eortc melanoma group study. *J.Clin., Oncol. Abstr.* 8519, 2007
13. Burton A.L., Roach B.A., Mays M.P. – Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in melanoma. *American Surgeon* 2011, 77(2), 188-192
14. Taylor R.C.Patel A., Panageas K.S.- Tumor infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J.of Clin. Oncol.* 2007, 25(7), 869-874
15. Mc Shane L.M., Altman D.G., Sauerbrei W et al. – Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (Remark) *J.of the Nat. Cancer Inst.* 2005, 97(16) 1180-1184
16. Wang J.F., Sarma D.P., Ulmer P. – Diagnostic dilemma: HBM-45 and Melan A negativ tumor, can it be still a melanoma?> MITF stain may confirm the diagnosis. *The Internet Journal of Dermatology*, 2007. 5(1), 2-7
17. Heegaard S, Jensen O.A., Prouse J.U. Immunohistochemical diagnosis of malignant melanoma of the conjunctiva and uvea> comparison of the novel antibody against MelanA with S/100 protein and HBM/45. *Melanoma Research* 2000, 10(4), 350-354
18. Busam K.J., Chen Y.T., Old L.J., et al. - Expression of Melan A (MART/1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. *Am.J.Surg. Path.* 1998, 22(8), 976/982
19. Auge J.R., Medina R., Fillela X. Et al. – S-100 â and MIA in advanced melanoma in in relation to prognostic factor. *Anticancer Research* 2005, 25, 1779-1782
20. Mettinen M., Fernandez M., Fransilla K. et al. – Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical diagnosis of metastatic mkelanoma > comparison with other four melanoma markers. *Am.J.Surg.Pathol.* 2001, 25(2), 2005-2011
21. Gonzales M.C., Badenas C., Malvey J. et al. – Prognostic vlue of tyrosinase RT-PCR analysis histologically negative sentinell lymph node from melanoma patients. *Asco. Annual Meeting* 2004, Abs. No. 7562
22. Kicler W., Grodecka-Gazdecka S., Breborowicz J.- Prognostic value of selected immunohistochemical markers in skin melanoma. *J. Of Oncology* 2002, 52(6), 487-495
23. Waisanen A.H., Kallioinen M., Turpeenniemi-Huynanen T. – Comparison of the prognostic value of matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous melanoma. *Hum. Pathol.*, 2008, 39(3), 377-385
24. Seala S., Ottaiano A., Ascierto P.A. et al. – Expression of CXCR4 predict poor prognosis in patient with malignant melanoma. *Clin. Cancer Reasearch*, 2000, 6(5), 1845-1853
25. Waston-Hurst K., Becker D. – The role of N cadherin, MCAM, and beta 3 integrin in melanoma progresion, proliferation, migration and invasion. *Cancer Bio Therapy*, 2006, 5(10) 1375-1382
26. Pung P.P., Sarlomo-Rikala M, La Sota J. et al. – Immun ohistochemical analysis of 1563 tumors including metastatic , desmoplastic and mucosal melanomas and their mimics. *Am.J.of Surg. Pathol.* 2012, 36(2), 265-292.
27. Ohasi A., Funasaka Y., Ueda M., Ichihashi M. – C-kit receptor expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocztic nevi. *Melanoma Research* 1996, 6(25), 570-576
28. Ianku F., Novotnz J., Tomankova V et al – C-kit expression in early stage of malignant melanoma. *ASCO Annual Meeting*. 2002, ABSTR. 1398
29. Fang D., Kgyuyen T.K,m Leishear K. et al – A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 2005, 65, 9328-9337

Conflict de interese
Nedeclarate

Conflict of interest
Non declared

Adresă de corespondență: E-mail: alecu.mihail@gmail.com
Correspondence adress: E-mail: alecu.mihail@gmail.com