

**MELANOM MALIGN ȘI
FACTORII DECLANȘATORI
AI TRANSFORMĂRII
MALIGNE**

LUCRARE ȘTIINȚIFICĂ

EMANUELA MARIA ANDREI

EDITURA EVOMIND

2 0 1 9

**MELANOMUL MALIGN
ȘI FACTORII DECLANȘATORI AI
TRANSFORMĂRII MALIGNE**

LUCRARE ȘTIINȚIFICĂ

Autor: Emanuela Maria ANDREI

Data apariției: ianuarie, 2019

Format: A4

Nr pagini: 82

ISBN: 978-606-94762-3-9

Editura: EVOMIND

Cuprins

PARTEA I. FUNDAMENTARE ȘTIINȚIFICĂ.....	7
EPIDEMIOLOGIE.....	8
I.1. Incidența.....	8
I.2. Vârsta	8
I.3. Sexul	8
I.4. Repartiția rasială a MM	8
ETIOPATOGENIE	10
II.1. Ipoteza transformării maligne a nevilor melanocitari.....	10
II.1.1. Nevii congenitali.....	11
II.1.2. Nevii câștigați	12
II.1.3. Nevul albastru.....	14
II.1.4. Nevii cu halou.....	14
II.2. Factorii declansatori ai transformării maligne.....	14
II.2.1. Traumatismul.....	14
II.2.2. Influența radiației solare	15
II.3. Relația dintre virusi și MM.....	17
II.4. Relația dintre regimul alimentar și MM	17
II.5. Ipoteza transmiterii transplacentare.....	18
II.6. Ipoteza transmiterii ereditare	18
BIOLOGIA MELANOCITULUI NORMAL ȘI A CELULEI MELANICE MALIGNE	20
III.1. Noțiuni generale despre melanocit.....	20
III.2. Morfologia și structura celulei melanice.....	22
III.3. Melanina și melanogeneza	23

III.3.1. Melaninele și structura lor	23
III.3.2. Procesul chimic al melanogenezei	25
III.3.3. Transferul granulelor de melanina	27
III.3.4. Melanozomii și fosfataza acida	28
III.3.5. Alte tipuri de celule producătoare de melanozomi.....	28
III.4. Factori care determină melanogeneza	29
III.4.1 -Radiația ultravioletă	29
III.4.2. Factorul endocrin.....	31
III.4.3. Factorul genetic	34
III.5. Melanocitele în culturi. Ciclul celular.....	36
MORFOLOGIA MELANOCITELOR DIN PROLIFERĂRILE MALIGNE.....	39
MORFOLOGIA MELANOAMELOR	44
V.I. Melanoamele cutanate benigne (nevii pigmentari).....	44
V.I.1. Nevul intraepidermal.....	44
V.I.2. Nevul displazic	45
V.2 Melanoamele cutanate maligne	47
V.2.1. Relația dintre nevi și melanoamele maligne.....	47
V.2.2. Melanomul malign in situ.....	48
V.2.3. Clasificarea histogenetică a melanoamelor maligne	49
V.2.4. Forme particulare de melanom malign.....	50
V.2.5. Metode de apreciere a profunzimii invaziei tumorale și importanța lor	51
V.2.6. Dificultăți de diagnostic în melanoamele cutanate.....	51
FORME ANATOMICE-CLINICE	53
VI.1. Lentigo melanic malign	53
VI.2. Melanomul malign cu diseminare în suprafața	54

VI.3. Melanomul malign nodular	54
VI.4. Lentigo malign acral	55
DIAGNOSTIC	58
VII.1. Diagnosticul pozitiv	58
VII.1.1 Diagnosticul clinic	58
VII.1.2 Diagnosticul paraclinic	58
VII.2. Diagnosticul diferential	60
VII.2.1 Nevul pigmentar benign	61
VII.2.2. Epiteliomul bazocelular pigmentat	61
VII.2.3. Veruca sau chetaroza boreica	62
VII.2.4. Granulomul patogensau botriomicomul	62
VII.2.5. Angiosarcimatoza Kaposi	62
VII.2.6. Comedoamele gigante	62
VII.2.7. Dermatofibromul pigmentat sau histocitomul	62
TRATAMENT	63
PARTEA a II-a. CONTRIBUȚIE PERSONALĂ	64
CAZURI CLINICE	64
CAZUL I	64
CAZUL II	65
CAZUL III	66
CAZUL IV	67
STATISTICĂ ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR	68
CONCLUZII	78
BIBLIOGRAFIE	79

INTRODUCERE

De ce am ales MM ca subiect al acestei lucrări ? Motivele sunt multiple.

MM este, poate, maladia care ridică cele mai multe semne de întrebare.

Patogenia bolii cu atâtea necunoscute, etiologia ei cu atâtea contradicții, clinica acestei afecțiuni atât de bizară uneori, în aspectele ei cele mai banale și pe deasupra terapeutică atât de deconcertantă și plină, deseori, de amare deziluzii, a creat impresia că această boală este „la bete noire” a oncologiei.

Abordarea în lucrarea de față a problemelor de diagnostic și terapie a MM, leziune identificată încă din antichitate, rezidă în necesitatea cunoașterii mai bune a acestei afecțiuni ce reprezintă o deosebită problemă pentru conduita terapeutică și pentru prognosticul vital.

Deși cu o etiologie imprecis conturată ca de altfel a tuturor neoplaziilor, factorii de risc traumatici, iritativi, expunerea la radiația ultravioletă sunt de acum identificați și trebuie implementați în cultura sanitară a populației, în vederea prevenirii malignizării leziunilor benigne ale sistemului melanocitar.

Necesitatea precocității diagnosticului este subliniată de către datele statistice care arată o supraviețuire de 70% la 5 ani a bolnavilor diagnosticați în stadiul I și de maximum 10% a celor diagnosticați în stadii tardive.

Lucrarea este structurată în două părți:

- Fundamentare științifică – 8 capitole
- Contribuție personală – 3 capitole

Ea cuprinde pe lângă o bogată parte teoretică și descrierea a 4 cazuri clinice, 20 de tabele, 12 grafice și 22 de referințe bibliografice.

Mulțumirile mele se adresează tuturor profesorilor Facultății de Biologie din Pitești și în special domnului Dr. MIHAI G. MAN medic primar anatomo-patolog care m-a îndrumat permanent și mi-a călăuzit pașii pe calea cunoașterii de-a lungul celor 2 ani de master în care am inițiat cercetări minuțioase asupra acestei boli.

PARTEA I. FUNDAMENTARE ȘTIINȚIFICĂ

CAPITOLUL I

EPIDEMIOLOGIE

Melanomul este întâlnit cu o frecvență de 1-3% din totalitatea cancerelor, realizând 0,75% din decese prin tumori maligne. Între tumorile maligne cutanate are o frecvență cuprinsă între 2 și 7%. În cazuistica I.O.C.N. melanomul reprezintă 1,7 % din totalitatea tumorilor maligne cutanate.

I.1. Incidența

Incidența variază între 0,1%000 de locuitori în regiunile nordice ale planetei și 17%000 de locuitori în Australia. Scher arăta că în 1979 în S.U.A. 2/3 din decesele prin cancer de piele aparțineau melanomului malign. În 1983, în România, mortalitatea prin MM reprezenta 0,75%000 de locuitori de sex masculin și 0,91%000 de locuitori de sex feminin.

În ultimile decenii, de pe toate meridianele se anunță o creștere a incidenței MM.

S-a observat o diferență a incidenței între mediul urban și rural, ultimul fiind gazda celor mai mulți bolnavi. De asemenea, s-a observat că persoanele care lucrează în mediul natural, sunt mai frecvent afectate decât cele care lucrează în mediul artificial, în aceeași zonă geografică.

Distribuția geografică a MM, corespunde ariilor de înaltă expunere la radiația solară.

I.2. Vârsta

Boala este foarte rară la copii. Între 10 și 19 ani Little a constatat o frecvență de 2% pentru băieți și 5% pentru fete. Vârsta de maximă frecvență a bolii este între 40 și 50 de ani.

I.3. Sexul

Cifrele de repartitie ale MM la cele două sexe variază în funcție de statistici.

Începând din stadiul III de boală, în toate statisticile frecvența cea mai mare a bolii se observă la bărbați. Tot ei pentru același stadiu de boală, prezintă, mult mai des decât femeile, invazia tumorală a ganglionilor regionali.

I.4. Repartiția rasială a MM

Un studiu statistic efectuat în Liberia arată că incidența bolii la negrii este de 3,8% din totalitatea tumorilor maligne, în timp ce la albi se ajunge la 7%. După Mann et al, incidența la

MM la negrii din S.U.A. este de 0,8%000, pe când la alibi din aceeași țară, ajunge la 4,5%000 locuitori. La negrii, 82% din melanoame sunt localizate pe membrele inferioare.

I.5. Repartiția topografică

Aproximativ 90% din totalitatea melanoamelor maligne sunt situate la nivelul pielii, restul fiind găsite, în ordine, pe ochi, agno-rect, vulva și vagin, căi aero-digestive superioare.

Referindu-ne la melanomul malign cutanat, se constată că localizarea cea mai frecventă este la nivelul membrelor 56,4%, dintre care 17,7% pe membrele superioare și 38,7% pe cele inferioare. Urmează trunchiul cu 22,3% și cap-gât cu 21,3%. În funcție de sex, la bărbați cea mai frecventă localizare este pe cap-gât și trunchi, pe când la femei predomină localizarea pe porțiunea inferioară a membrelor inferioare.

Densitatea cea mai ridicată a melanomului este pe pielea capului și gâtului, unde, pe unitatea de suprafață, are o frecvență de 4 ori mai mare decât pe celelalte regiuni anatomice.

CAPITOLUL II

ETIOPATOGENIE

II.1. Ipoteza transformării maligne a nevilor melanocitari

Din numeroasele observații clinice și histologice reiese că la un număr semnificativ de bolnavi melanoamele maligne apar în asociere cu nevi melanocitari. Aproximativ 75% din pacienți recunosc în antecedentele personale, existența de mult timp a unor “pete” pigmentare pe locul unde, în prezent, depistăm melanomul malign. Controversele privitoare la asocierea dintre nevi melanici și melanoma au fost concentrate asupra secvenței nev-melanom. După Pack posibilitatea de transformare malignă a nevilor melanocitari este de 1:1.000.000 de nevi, iar transformarea malignă poate fi demonstrată histologic cu totul excepțional. În același timp s-a pus și întrebarea dacă melanocitele din nevi diferă în vreun fel de cele din epidermul normal.

Clark et al, a propus o schemă a evoluției de la nev la melanom, în care nevi au un ciclu de viață bine definit, care începe în copilărie, adolescență sau la adultul tânăr, proliferarea melanocitelor în focare circumscrie, la nivelul joncțiunii dermo-epidermice, progresând apoi spre nevul dermal și sfârșind prin involuția spontană, într-o perioadă mai târzie a vieții. Unii nevi nu urmează această cale comună mării majorității. Melanocitele lor continuă să prolifereze, pătrunzând în zona bazală a epidermului adiacent, unde continuă să sufere o maturare mai puțin normală. În cele din urmă în interiorul acestei populații joncționale apar proliferații ale melanocitelor, cu dezvoltarea unor atipii celulare și creșteri tisulare dezordonate, care formează așa numita displazie melanocitară. Următoarea secvență evolutivă este apariția melanomului *in situ* și apoi a melanomului invaziv.

Aceste observații nu au răspuns însă la întrebarea care este diferența între melanocitele nevice și cele din epidermul normal. În acest sens se consideră că melanocitele din nevi sunt mai susceptibile de a se modifica, sub acțiunea unor factori de mediu intern și extern, față de cele din epidermul normal. Analize multifactoriale atrag atenția că melanoamele care apar „*de novo*”, diferă biologic de melanoamele care se dezvoltă din nevi melanocitari, în sensul că ultimele au un pronostic mult mai bun. Sober constată că absența nevilor asociați melanomului se corelează semnificativ cu decesele precoce ale bolnavilor din stadiul I de boală, comparativ cu bolnavii la

care această asociere este prezentă. Ambele studii vin să sublinieze că melanoamele ce apar din melanocitele nevice au unele caractere biologice diferite față de melanoamele care apar din melanocitele epidermului normal.

II.1.1. Nevii congenitali

Dubreuilh a arătat în 1912 că nevi care apar în primele zile de viață, suferă deseori transformări maligne, de aceea i-a numit “melanoame precanceroase circumscrise”. Beker în 1945 subliniind și el pericolul transformării maligne a acestor nevi, i-a numit “*lentigo malign*”. În prezent toți cercetătorii sunt de acord că dintre nevi congenitali, cei giganți sunt cei mai capabili de a se transforma malign. Aici este necesar să prezentăm caracterele clinice și histologice care încadrează un nev congenital în grupa nevilor giganți. Clinic Walton considera nevi congenitali pe cei apăruiți de la naștere. Histologic Mark considera nevi congenitali acele leziuni prezente de la naștere și care prezintă: “penetrația celulelor nevice printre bandelele de colagen a celulelor 2/3 inferioare ale stratului dermic reticular”. Definiția de nev gigant diferă după autori. Rhodes considera nev gigant o leziune care după extirpare nu permite închiderea plăgii prin sutura tegumentelor. Constanzi definește nev gigant o leziune cu suprafața de mărimea palmei pacientului pentru cap și gât, sau de două ori mai mare ca aceasta, pentru alte localizări. Proporția de transformare malignă a nevilor congenitali a fost apreciată de Reed la 32%. Malignizarea apare în medie la 30 de ani de la extirparea nevilui gigant, de cele mai multe ori (33%) sub grefa de piele aplicată pe zona denudată chirurgical.

Potențialul de transformare malign a nevilor melanocitari congenitali a fost și a rămas un subiect foarte controversat datorită concluziilor diferite la care s-a ajuns în ceea ce privește criteriile de diagnostic și necesitatea îndepărtării profilactice a acestor leziuni.

Incidența apariției MM pe nevi congenitali a fost estimată de Metcalf între 5% și 20%, urmărind pacienții pe durata întregii lor vieți.

Deși îndepărtarea chirurgicală a nevilor congenitali mici și mijlocii nu ridică probleme tehnice deosebite, importanța extirpării lor profilactice rămâne o problemă deschisă. Kopf considera că, deși uneori se observă modificări maligne la nivelul nevilor congenitali neextirpați, procentul lor este foarte mic, iar riscul de transformare malignă nu justifică îndepărtarea de rutină a leziunilor. Pe de altă parte Rhodes analizând incidența melanoamelor apărute în continguitate cu nevi melanocitari care au caractere histologice de „congenitali”, au găsit această asociere la

8,1% din 234 de pacienți. Nici unul din acești bolnavi nu a prezentat leziuni atât de mari încât plaga să nu poată fii închisă prin sutura buzelor sale. În studiul lor, autorii trag concluzia că procentul de transformări maligne diferă după modul clinic sau histologic, de stabilire a diagnosticului. În prima variantă incidența transformării maligne oscilează între 9 și 41% pe când după aprecierea histologică aceasta scade la 2,6-8,1%. Din acest motiv se consideră că îndepărtarea profilactică a leziunii ar putea avea un efect benefic pentru pacient. În același timp diferențele mari în incidența transformării maligne, atrag atenția și asupra criteriilor de defnire a nevilor congenitali. Din nevi prezenți la naștere, mulți, dacă nu toți, nu prezintă caractere histologice de „congenitali”, iar pe de altă parte examenul histologic al unor nevi dobândiți, poate arăta imagini caracteristice nevilor congenitali. Pentru o mai bună diferențiere, Stenzinger et al., au analizat conținutul în ADN al nevilor și au ajuns la concluzia că unii nevi congenitali pot să conțină în nucleul celular, un ADN anormal (aneuploid), pe când la nevi câștigați niciodată nu s-a constatat această anomalie.

ADN-ul aneuploid a fost privit ca un marker al transformării maligne, ceea ce i-a făcut pe autori să propună testarea sa în nevi, pentru a putea depista eventuala evoluție spre malignitate.

II.1.2. Nevii câștigați

La fel ca și în cazul nevilor congenitali, relația dintre nevi melanocitari dobândiți și melanomul malign este greu de stabilit. Deși în prezent este general acceptat faptul că unele melanoame apar din, sau cel puțin în asociere cu nevi melanocitari dobândiți, există încă unele întrebări la care nu s-a răspuns. În 1979 Lopansri și Mihm notau că frecvența MM apărută din sau în asociere, nevi melanocitari dobândiți variază între 18 și 83%, cifra depinzând de criteriile de diagnostic folosite de cercetător.

În seria autorilor, 285 de cazuri, 35% din melanoame au fost asociate cu nevi melanocitari, $\frac{1}{4}$ fiind diagnosticați, atât prin antecedente, cât și prin examen histologic cu nevi congenitali. Reiese de aici că o confirmare histologică a preexistenței nervului benign are o importanță particulară deoarece informațiile clinice sunt de obicei lacunare și chiar un clinician cu experiență nu poate evalua 100% potențialul biologic al unor leziuni pigmentare. Dar chiar evaluarea histologică a melanocitelor intradermale adiacente melanoamelor poate fi subiect de eroare.

Acceptand ca unele melanoame sunt asociate cu nevi melanocitari castigati, se pune intrebarea care dintre acesti nevi au potential de transformare maligna. In prezent, cu exceptia catorva cazuri la care prin examen histopatologic a fost demonstrata componenta intradermala a nevilui transformat malign, se accepta ca melanocitul intraepidermal poate fi subiectul transformarii maligne. Plecand de aici se pune intrebarea: toti nevii jonctionali sau compusi reprezinta un risc de transformare maligna? Daca raspunsul este negativ, apare intrebarea fireasca, care sunt criteriile clinice sau histologice prin care se poate intrevea posibila transformare maligna, pentru a putea interveni profilactic? Clinic melanoamele care apar din nevii jonctionali in stadiile cele mai incipiente, se prezinta ca niste mici macule aparent nediferentiabile de nevil jonctional, care ulterior incepe sa creasca, adesea cu aspect centrifugal, neregulat, devenind disimetrice. Pigmentarea va deveni neuniforma. In marea majoritate a cazurilor, diferentierea histologica intre benign si malign nu poate fi facuta cu certitudine.

In alte cazuri se pot gasi leziuni melanocitare jonctionale in care, cu toate ca lipsesc aspectele de malignitate, nevii jonctionali prezinta unele atipii, in sensul ca nevii pot aparea clinic si histologic, mai putin bine circumscrisi si sunt formati pe langa cuiburile de melanocite situate in zona jonctionala si din melanocite dispersate in epiderm. In acest stadiu se constata diferente in dimensiunile si formele cuiburilor celulare, precum diverse grade de atipie celulara. Cu toate ca aceste modificari, in unele cazuri, pot reflecta o faza de crestere activa a nevilor jonctionali benigni, cu timpul ele pot deveni semne ale leziunilor premaligne sau chiar ale unor melanoame *de novo*, incipiente.

Un precursor probabil al MM este nevil compus. Din punct de vedere clinic acesti nevi au dimensiuni in jur de 5mm, posedea un halou cu forma si pigmentare neregulata. In anamneza pacientul, deseori recunoaste preexistenta unei Pete mici, cu vechime de ani, pe locul leziunii actuale. Histologic, in marea majoritate a cazurilor, componenta maligna este centrata in jurul zonei jonctionale si se descrie cu elemente histologice ale melanomului, cu diseminare in suprafata, cu sau fara invazie. In jurul sau in melanomul respectiv se pot gasi cuiburi de melanocite mature ce reprezinta componenta dermala a nevilui preexistent

Referindu-se la posibilitatile evolutive ale nevilor dobanditi, Costanzi afirma in 1984 ca 35% din melanoamele cu diseminare in suprafata, si 25% din melanoamele nodulare se dezvoltă

din aceste leziuni preexistente. De asemenea el sustine ca 4% dintre pistrui pot sa se transforme malign.

II.1.3. Nevul albastru

Nevii albastri sunt considerati de ce mai multi cercetatori ca hamartoame provenite din migrarea melanocitelor din creasta neurala la derm, in timpul vietii fetale. MM ce apar din nevi albastrii sunt rare. Malignizarea se manifesta prin cresterea indicelui mitotic, aparitia nucleelor anormale si frecventa ariilor de necroza tumorală.

Melanoamele provenite din nevi albastrii se deosebesc de cele provenite din melanocite cu origine epidermica prin pierderea componentei intraepidermale si prin prezenta obisnuita a dendritelor anaplastice sau a melanocitelor cu aspect de paianjen.

II.1.4. Nevii cu halou

Nevii cu halou sunt descrisi clinic ca niste nevi melanocitari inconjurati de o zona depigmentata. Aceasta zona reprezinta o regresie imuna a nevilui. Histologic se poate observa in zona de regresie, dezorganizari ale cuiburilor celulare cu aparitia de atipii citologice.

Studiile ale lui Bennett et al. Care au utilizat ser provenit de la pacientii cu melanom, pacienti cu nevi halou si antiser antimelanin prelevat de la sobolani, arata ca celulele nevice din nevi cu halou si melanoamele sunt imunologic similare si in acelasi timp diferite de melanocitele normale si de celulele nevice. Aparitia haloului este pusa pe seama unei reactii imune aparuta fie datorita unei componente virale fie unor injurii cu efect letal sau mutagenic asupra celulelor nevice, care au interferat propria sinteza de melanina, la fel cum a fost descrisa in melanocitele din vitiligo.

Asocierea dintre nevi cu halou si melanom s-a facut datorita unor descrieri sporadice, dar care prin saracia cazurilor nu poate stabili daca melanomul a aparut in nevil cu halou sau nevil cu halou este de fapt un melanom in faza de regresie.

II.2. Factorii declansatori ai transformarii maligne

II.2.1. Traumatismul

Citand date din literatura. Dimitrescu 1975, implica traumatismul in transformarea maligna a nevilor benigni. Intr-o proportie de 30-40%. Traumatismele pot fi cronice blande, cum

ar fi iritatiea cornica data de bretele, sutine,curea,pantofi care strang,zgarieri repetate la barbierit, sau traumatisme unice dar brutale ca legarea unor nevi pediculati sau arsurile.Traumatismele unice sau brutale sunt intalnite in istoricul melanoamelor maligne intr-o proportie de 12-15%.Daca opinia unor autori, durata dintre aplicarea unui traumatism brutal asupra nevilui si aparitia melagnizarii este de 1-2 luni, de aceea se recomanda indepartarea nevilui in primele 48 de ore de la aplicarea traumatismului,Desi alti autori minimalizeaza rolul etiologic al traumatismului observatia clinica a condus la concluzia ca iritarea nevilor prin iradiere sau cauterizare trebuie evidentiata, deoarece poate cauza declansarea transformarii maligne.Ewing 1950 a constatat ca stimulii traumatici aplicati asupra terminatiilor nervoase cutante, pot initia unele modificari in celulele nervilor senzitivi, ce ar face posibila virarea spre melanom.

Rareori s-a observat melanoamele maligne la nivelul cicatricilor. Dupa Traves si Pack incidenta aparitiei unui MM pe o cicatrice este de 2%. Raritatea melanomului pe cicatrici este data de lipsa melanocitelor de la acest nivel.Se pare ca lipsa factorilor de aparare imunolocala,precum si vascularizatia precara a zonei, ar fi factorii favorizanti ai transformarii maligne de la nivelul cicatricelor.

II.2.2.Influenta radiatiei solare

Datele epidemiologice indica faptul ca expunerea la radiatiile solare poate fi un factor declansator atat al aparitiei MM, cat si al nevilor.Cercetari efectuate in tari in care expunerea la radiatia solara este indelungata in timpul anului au aratat ca acolo incidenta MM cutanat este ridicata.

Lee in 1975 introduce in epidemiologia MM cutanat termenul de “gradient de latitudine” termen care subliniaza ca incidenta melanomului creste odata cu cresterea latitudinii.Se mai foloseste si termenul de “gradient litoral” prin care se intelege ca cu cat ne indepartam de tarmul marii, indicenta MM scade.Urmarindu-se incidenta MM la populatiile permanent expuse radiatiilor solare, s-a constatat ca aceste prezinta o cifra mai scazuta de indientafata de populatiile din aceasi regiune, care se expun temporar dar intens razelor solare.Acest fel de expunere duce, aproape constant, la aparitia eritemului cutanat, iar histologic la distrugerea partiala a celulelor LANNGERHANS epidermice, celule care ar fi responsabile de apararea imuna a tegumentelor.

Rapoartele citate de Shaw 1980 constata o crestere a incidentei MM cutanat la 2 ani dupa consemnarea unei augmentari a activitaii solare, deci o crestere clinica de 11 ani, perioada constata de astrofizicieni ca limita intra 2 “explozii” solare de mare intensitate.

In sprijinul ipotezei “solare” in etiologia MM vin si fapetele clinice care constata ca la nivelul zonelor permanent protejate de radiatia solara, incidenta MM este cea mai redusa din punct de vedere topografic.Astfel se explica si diferentele topografice ale MM la cele 2 sexe. La femei unele obiceiuri vestimentare lasa aproape permanent extremitatile descoperite, incidenta MM este de cca 60% pe cand la barbati aceasta localizare este de 2 ori mai redusa.

In lumina aceste ipoteze s-ar parea paradoxala frecventa redusa a MM la nevii din aceleasi regiuni unde albii au o frecventa crescuta de MM.Explicatia ar fi ca la acelasi numar de melanocite existent la ambele populatii, cantitatea de pigment melanic cu rol protector este mai mare la populatia de culoare.Un alt argument clinic, il constituie faptul ca purtatorii de xerodermapigmentoasa, boala produsa de expunerea la iradierea soalara, incidenta MM este cu 3-4% mai mare decat la restul populatiei.

Majoritatea autorilor sunt de parere ca radiatia ultravioleta a spectrului solar, ar fi de fapt factorul cauzator al melanomului.Experimental, Scot Otto si colaboratorii au constatat ca paralel ci cresterea timpului de expunere la razele ultraviolete incidenta tuturor cancerelor cutanate prezinta o curba ascendenta.

Unele tehnologii moderne folosite in viata cotidiana favorizeaza prezenta cantitatii crescute de raze ultraviolete la nivelul scoartei terestre.Este cunoscut faptul ca patura de ozon ecraneaza Pamantul in fata radiatie ultraviolete.Folosirea diferitelor sprayuri, al caror continut este vehiculat cu ajutorul florocarbonului, agent ce reduce cantitatea de ozon, precum si inmultirea avioanelor supersonice, mari consumatoare de ozon,fac ca aceasta patura protectoare sa se subtieze permitand unei cantitati crescute de radiatii solare sa ajunga la nivelul scoartei terestre.

Pe langa reducerea numarului de celule Lanngerhans, expunerea indelungata la lumina solara produce in tegumente o serie de modificari ca: dilatarea vaselor din plexul subpapilar, degenerarea hiperplazica a fibrelor de colagen si elastice,uneori atrofia epidermului si dermului cu o pierdere a colagenului dermal si subtierea marcata a dermului.Concomitent are loc o crestere a activitatii melanocitare care stau la baza pistruilor.

Nu toate cercetarile ajung insa la aceleasi concluzii cu privire la participarea radiatiilor solare in aparitia MM cutanat.Sunt observatii care arata ca in Norvegia incidenta MM la barbati este de 20 de ori mai mare decat la Zaragoza Spania – provincie sudica captatoare a unei cantitati mari de raze ultraviolete. Aceeasi concluzie se desprinde si din observatia care atesta ca populatia mediteraneeana prezinta o rata de mortalitate prin MM foarte redusa comparativ cu tarile nordice.Acest fapt ar putea fi explicat prin deficitul pigmentar al locuitorilor din nordul continentului cunoscut fiind faptul ca pigmentii melanici au un rol protector in fata radiatiilor solare.

S-a constatat de asemenea la Ecuator, incidenta MM cutanat este aceeași, atat pe partile expuse cat si pe partile neexpuse iradierii solare.Cercetarile efectuate pe marginea acestor observatii, i-a facut pe Lee si colab. sa considere ca suba actiunea radiatiilor solare in zona de expunere apare un “factor de eliberare solar” care patrundand in cirkulatia generala, prin determinare genetica devine un factor melanogenetic,

Aparitia MM este in legatura cu culoare parului si a ochilor, precum si cu sensibilitatea pielii.Cea mai evidenta asociere este intre melanom si subiectii cu parul blond unde riscul relatic de aparitie al bolii, comparativ cu brunetii, este de 7:1.Asocierile au fost indiferente de originea etnica si expunerea la soare, ceea ce confirma ipoteza existentei factorului melanogenetic cu determinare genetica.

II.3.Relatia dintre virusi si MM

Depistarea anticorpilor antimelanici in piesele de biopsie a condus la avansarea ipotezei privitoare la posibilitatea interventiei in etiologia MM a unor factori infectiosi.In acest sens Pearson 1975 descopera la 15 din 20 de piese de biopsie particule asemanatoare virusilor.Rezultate asemanatoare au fost comunicate si de alti autori, dar pana in prezent aceasta descoperire a ramas doar la faza de ipoteza.

II.4. Relatia dintre regimul alimentar si MM

Rezultatele cercetarilor lui Mackie 1974 duc la concluzia ca alimentele bogate in grasimi polisaturate determina reactii cutanate, care afecateaza in primul rand picioarele.Aceasta predilectie de localizare, se pare ca s-ar datora cirkulatiei incetinite care perminte expunerea mai

indlungata la agentii cancerigeni circulanti. Asocierea acestor agenti cu radiatia solara ar constitui unul din factorii etiologici ai MM. Ipoteza este inlaturata insa de observatiile etimologice ce arata ca in regiunile anatomice cu viteza de circulatie a sangelui mai mare, dar cu expunere mai indlungata la actiunea razelor solare cum ar fi capul, gatul sau trunchiul, in incidenta cu MM este cel putin egala cu cea de pe membrele inferioare.

Experimental s-a constatat ca incidenta tumorilor cutanate induse de soarece prin dibenzantracen, a crescut atunci cand grasimile reprezentau 15% din dieta respectiva. S-a constatat, de asemenea experimental, ca folosind diete echicalorice, dar cu continut diferit de grasimi, la animale unde caloriile au fost produse de grasimi, incidenta tumorilor cutanate a cunoscut o crestere semnificativa.

Williams 1976 et al. gaseste o legatura ipotetica intre consumul de alcool si cresterea secretiei hipofizare de MSH, prin stimularea nespecifica a hipofizei de catre alcool.

II.5. Ipoteza transmiterii transplacentare

In 1930 Weber et al. descriu cazul unei femei gravide suferinde de MM generalizat care a decedat la luna 3 dupa o nastere prin sectiune cezariana. Placenta continea tumori melanice, iar copilul aparent sanatos la nastere, dupa 8 luni prezenta un ficat marit in volum, nodular. Decedea la 11 luni iar necropsia a evidentiat tumori melanice metastazice in ficat, ganglionii limfatici, plamani si piele. Experimental Reting si colab. in 1976 au gasit celule canceroase circulante la produsul de conceptie al unor femele inoculate cu celule canceroase. Atata timp insa cat s-au citat numai cateva cazuri de transmitere transplacentara a bolii, ipoteza nu poate fi acceptata din punct de vedere epidemiologic mai ales ca majoritatea melanoamelor sunt diagnosticate la mult timp dupa nastere.

II.6. Ipoteza transmiterii ereditare

Arata ca un melanom malign poate fi considerat ca fiind ereditar daca indeplineste urmatoarele 3 conditii:

- Tumoara descendentilor sa fie de acelasi tip histogenetic;
- Tumora sa aiba originea in acelasi tip de organ;

- La descendentii directi, aparitia tumorii sa se produca aproximativ la aceeasi varsta sau la generatiile succesive, la varste din ce mai tinere.

Un element in definirea MM transmis ereditar, este frecventa crescuta a tumorilor primare multiple si a plurifocalitatii melanomului. Frecventa tumorilor primare maligne multiple, variaza in literatura intre 10,5-27%, iar varsta aparitiei la urmasi este mult mai mica decat la ascendenti. Asocierile cele mai frecvente ale melanomului malign sunt cu neoplazmele de san, cancerul de colon, de ovar si de tesut limfopoetic.

Mecanismul transmiterii ereditare al unei susceptibilitati crescute pentru dezvoltarea MM nu este cunoscut dar a fost atribuit unei gene dominante autosomal cu penetrare incompleta. Se presupune de aseamenea ca transmiterea genetica este poligenica, pornind de la un numar nedeterminat de alele, spre locuri separate, transformate sub actiunea unei componente citoplasmice.

CAPITOLUL III

BIOLOGIA MELANOCITULUI NORMAL SI A CELULEI MELANICE MALIGNE

III.1. Notiuni generale despre melanocit

Melanocitele sunt celule dendritice producatoare de pigment (melanina) care se gasesc in epiderm intercalate intre celulele stratului bazal (jonctiunea dermoepidermica) si in bulbul firului pilos intre celule matrice parului. Se mai gasesc in cavitatea bucala, portiunea nazala a faringelui, esofag, urechea interna, ochi (iris, coroida), leptomeninge, mamelon si organele genitale externe in derm: la negri si in regiunea sacro-coccigiana a copiilor nou nascuti in rasa mongola in jurul vaselor sanguine si a nervilor periferici. Procesul pigmentarii pielii nu se datoreaza exclusiv melanocitelor ce produc melanina, ci este un rezultat al actiunii combinate a melanocitelor si keratinocitelor. Denumirea keranocite este acceptata de majoritatea autorilor, inclusiv se specialistii romani, pentru a sublinia caracterul functional al celulelor diferitelor straturi ale epidermei, inclusiv al stratului bazalm reprezentand diferite stadii in evolutia lor spre keratinizare (celulele stratului bazal si mucos continand un aparat tonofibrilar care este considerat ca precursor plastic keratinei).

Melanocitele isis mentin pozitia printre celulele stratului bazal prin mijlocirea proceselor citoplasmatiche. Celulele melanice se intind, datorita dendritelor lor, pe distante mari printre celulele epidrmice si dispar in spatiile formate de acestea, ajungand chiar in straturile epidermice superioare sau se termina țesindu-se pe suprafata keranocitelor adiacente. De asemenea, ele pot forma un sincițiu unind prelungiri similare ale altor melanocite intre-un lanț congluent. Semnificația si natura acestor contacte este necunoscuta dar așa cum arata Fitzpatrick și Breathnach, datorita lor ar putea fi posibila existența “unitații melanice a epidermei” constand din melanocite și un anumit numar de keratinocite. Melanocitele sunt dispersate printre celulele stratului bazal in proportie de 1 la 8 sau 1 la 10.

În condiții normale, melanocitele din piele formează un strat continuu neîntrerupt pe toată suprafața pielii, numărul lor variind între 800 și 2000/mm pătrat de piele umană. Densitatea medie a celulelor malnice este circa 1300-1500/mm pătrat fiind specifică fiecărei părți a corpului și relativ constantă pentru aceeași parte. Cantitativ populația de melanocite din epiderma umană este estimată de circa 2 miliarde de celule cântărind aproximativ 1g. Densitatea melanocitelor este aceeași la rasa albă ca și la cea neagră, diferența de culoare constând în intensitatea activității acestor celule în producerea granulelor de melanina care, la rasa neagră, se găsesc și în straturile superioare ale epidermei, inclusiv în celulele stratului cornos.

Pentru stabilirea caracterului de celulă melanocitară în activitate, se utilizează dopareacția lui BrunoBloch sau, mai nou, cu tirozină marcată.

În urma cercetărilor efectuate la soarece, atât în perioada parentală și postnatală s-a observat că de o importanță extremă în stabilirea numărului melanocitelor din epiderma este metoda folosită. Ca urmare, a fost pusă la punct de către Mishima, o metodă complexă numită reacția dopapremelanina. Aceasta constă în tratarea cu azotat de argint amoniacal a tesuturilor incubate cu DOPA. DOPA pune în evidență activitatea tirozinazei, azotatul de argint amoniacal se atașează pe melanina dar și de melanozomii nemelanizați, elemente înrudite cu tirozinaza activă.

Deși melanocitele se găsesc răspândite printre celulele stratului bazal și amândouă tipurile de celule contribuie, fiecare în felul ei, la pigmentarea pielii, originile lor este relativ diferite: celulele epidermice deriva din ectoderm iar melanocitele au o origine neuro-ectodermală, derivând din creșterile neurale: în stadiul incipient al dezvoltării embrionare, celulele, celulele creștelor neurale migrează spre epiderm trecând prin derm. Ele au rolul de a secreta granulele de melanina pe care le transferă apoi keratinocitelor care, la rândul lor, se colorează puternic brun.

Pe lângă melanocitele obișnuite producătoare de pigment, mai există în straturile superioare ale epidermei aceste celule dendritice cu afinitate pentru sărurile de aur, numite celule Langerhans. Și aceste celule ca și melanocitele, se găsesc în interacțiune cu keratinocitele prin prelungirile lor dendritice, lerner presupune că melanocitele pot fi distruse printr-un proces imunologic, celulele Langerhans putând fi unul din componentele sistemului imunologic.

III.2.Morfologia si structura celulei melanice

Morfologia melanocitelor normale este extrem de variata in ceea ce priveste forma, marimea si numarul de ramificatii, putandu-se evidentia in acelasi preparat celule sferice, ovale, stelate, uni- sau multidendritice. In biopsiile de piele din partile expuse la soare domina celulele multidendritice, in timp ce in portiunile neexpuse pot fi observate celule rotunde, unidendritice. Dendritele sunt de 2 feluri: subtiri si groase. O particularitate a dendritelor groase este capacitatea lor de a invada celulele epidermice bazale, patrundand prin deschiderile din membrana acestora cu intentia posibila de a transfera melanozomii formati in melanocit.

Forma melanocitelor aminteste de forma neuronilor, fiind si acesta un argument in sprijinul originii nervoase a melanocitelor.

Suprafata melanocitelor este neteda, insa unele celule prezinta nenumarate umflaturi si proliferari cu vezicule , microvezicule si microvili. Rolul acestor structuri nu este inca cunoscut. Drzewiecki arata ca exista deosebiri intre melanocitele normale si cele maligne, desi morfologia celulelor melanice variaza destul de mult, s-au putut totusi descrie 4 tipuri de suprafata celulara prin care se exprima de fapt 4 faze ale ciclului celular: G1, S ,G2 si M, un rol deosebit in aceste transformari avandu-l AMP-ciclic (cAMP).

Drzewiecki si Piltz-Drezwiecka, studiind morfologia si intensitatea diferita a coloratiei cu DOPA la melanocite, au ajuns la ideea existentei unei “functii ciclice a celulei melanice” in epiderm. Ciclul incepe cu celula adendritica, ovala , slab colorata. O intarile a coloratiei spre brun este insotita de o dezvoltare a dendritelor. Melanotiele pot fi usor observate in aceasta faza deoarece keratinocitele deschise la culoare formeaza un fundal puternic contrastant. Apoi urmeaza transferul granulelor de melanina spre celulele epidermice inconjuratoare care se coloreaza in brun. Melanocitele se contracta odata cu expulzarea melanozomilor, de decoloreaza si nu mai pot fi observate din cauza numarului mare de celule epidermice brune.

Elementul structural si functional particular a melanocitelor il constituie prezenta de premelanozomi si melanozimi in diferite stadii de melanizare.

Melanozomii sunt organite citoplasmice in care se formeaza si se depoziteaza melanina. Dezvoltarea melanozomilor presupune atat sinteza de melanina cat si asamblarea si organizarea unei matrice proteice. Studii electroforetice incica prezenta a diferite feluri de matrice proteice, iar structura interna a malanozomilor este alcatuita dintr-o combinatie de proteine structurale si

enzimatice. Structura finala a melanozomilor nu poate fi separata de procesul de melanogeneza, proces care are loc la nivelul melanozomilor prin oxidarea enzimatica a aminoacidului tirozina in prezenta tirozinazei.

III.3. Melanina si melanogeneza

III.3.1. Melaninele si structura lor

Functional melanocitul trebuie privit ca o celula in sensul histologic al cuvintului sau ca o veritabila “ glanda secretoare unicelulara” care produce melanina.

Frumusetea si varietatea intregului regn animal rezulta din pigmentii prezenti in tegumenetele tuturor animalelor. Natura pigmentilor este determinata de substratul genetic al organismului, pigmentii avand functii biologice bine determinate precum : recunoasterea sexuala dintre specii, camuflajul fata de pradatori si protectia fata de radiatia solara.

Principalii pigmenti ai animalelor sunt *melaninele*.

Melaninele sunt impartite in 3 grupe: eumelaninele, feomenlaninele si trichocromii.

Eumelaninele dau culoarea bruna a pielii umane sau tegumentelor cuticulei diferitelor vietuitoare din regnul animal si ofera protectia impotriva radiatiilor solare, in special impotriva radiatiilor UV. Ele contin cantitati substantiale de indoli si au o structura puternic conjugata. Prin polimerizarea 5,6-dihidroxiindolului se obtine o forma tridimensionala cu o greutate moleculara mare, un polimer insolubil care este atasat de o proteina prin reactia de legare a chinonei cu grupurile amino- so sulfhidril pentru a forma produsul final, melanoproteina.

Studiile de difratie in raze X indica o structura retea in care sunt asezate inelele indolice. Riley a denumit acest polimer foarte regulat *eumelanina ideala*. Intr-o astfel de structura ideala , mici piedici sterice intre inelele adiacente ar produce o rotatie de 30 de grade intre indolii succesivi. O stiva de astfel de polimeri ar avea in inalta eficienta in absorbtia luminii. In conditiile fiziologice de formare a melaninei apar insa devieri de la structura ideala si sunt incorporat in polimeri diferiti intermediari rezultati din oxidarea tirozinei si anume : ciclodopa, 5,6-dihidroxiindol-9-carboxilic. Efectul acestor intermediari in polimer este de a reduce gradul de conjugare al macromoleculei determinand o diminuare a absorbtiei luminii in spectrul vizibil. Ca urmare, are loc elaborarea mai multor pigmenti brunii.

Factorii care controleaza gradul de incorporare a produsilor de oxidare a tirozinei in molecula melaninei nu sunt cunoscuti. Probabil ca activitatea tirozinazei si potentialul redox din melanozomi exercita o influenta inportanta asupra compozitiei pigmentului. Astfel, un nivel ridicat de tirozinaza ar putea determina formarea unui pigment mai inchis la culoare, cu un continut ridicat de indoli. Este cunoscut faptul ca melanina are rolul de a proteja organismul impotriva reatiilor de fotosensibilizare. Mecanismul acestei actiuni de protectie nu este inca lamurit. Se presupune ca aceasta proprietate se datoreaza absorbtiei radiatiilor de catre melanina deoarece melanina contine radicali liberi si este capabila sa participe la unele reactii de transfer de electroni. Melaninele contin radicali liberi in toate conditiile experimentale cunoscute. Radicalii liberi sunt sensibili la lumina fiind puternic afectati de radiatiile solare. Fotoliza suspensiilor apoase in curent de aer a eumelaninei duce la o crestere imediata a numarului de radicali liberi cu o scadere concomitenta a oxigenului din mediu. Consumul de oxigen variaza in functie de pH, lumina, temperatura si melanina.

Pielea persoanelor adaptate la o expunere de lunga durata la soare arzator contine mai multa melanina decat cea a persoanelor care traiesc la latitudini nordice, unde expunerea la radiatiile solare este mult mai mica.

Melaninele se gasesc nu numai la animale, ci si in cadrul regnului vegetal, producandu-se in cantitati mari la ciuperci. Amintim numai ca datorita multiplilor precursori ai melaninei, diversitatea structurala a melaninelor din ciuperci este mult mai mare decat cea a melaninelor animale.

Feomelanilele formeaza pigmentul corespunzator de culoare rosie a parului uman. Purtatorii prezinta anumite reactii anormale la lumina precum aparitia pistruiilor si o mare sensibilitate la cancerul de piele. Aceste reactii au fost atribuite faptului ca pielea lor contine prea putin pigment, face usor arsuri (insolatie) si are o slaba capacitate de bronzare. Totusi, cu ajutorul microscopului electronic s-a demonstrat ca feomelanina se produce cantitativ la fel, atat in pielea umana cat si in firele de par. Feomelanina este distrusa sub actiunea razelor UV in prezenta oxigenului, lucru care explica sensibilitatea oamenilor cu parul rosu la razele soarelui. Spre deosebire de eumelanine, feomelaninele sunt solubile in solutii alcaline diluate. Aceasta proprietate a dus la separarea si definirea mai multor feomelanine. Au trecut 10 ani pana s-a constatat ca feomelaninele se formeaza prin mod natural prin combinarea unui nou aminoacid,

cistenia (Cys), cu dopachinona care rezulta prin oxidarea enzimatica a tirozinazei. In 1964, Cleffmann, lucrând la celulele de pigmentare se soarece mutanta agoti *in vitro*, a ratat ca cistenia se acumuleaza in granulele de feomelanina. Reactia cheie in sinteza feomelaninei este formarea de 5-S- si 2-S- cisteinildopa. Rorsman a crezut initial ca prezenta 5-S- cisteinildopa in tesut indica formarea feomelaninei, care constata repede acest compus poate fi gasit in toate melanoamele pigmentate chiar si la cei africani la care nu exista niciun semn clini de pigmentare feomelanica. 5-S- cisteinildopa a fost pusa ub evidenta si in pielea nomala . Cu toate ca oamenii cu parul rosu excreta in urina o cantitate mai mare de 5-S- cisteinildopa s-a constatat clar ca toti oamenii, indiferent de culoarea parului, excreta in urina aceasta substanta. Agrup a demonstrat ca aceste substante sun sintetizate si excretate de catre toate melanocitele active, cisteinildopa fiind eliminata prin urina in special la oamenii cu melanon malign.

Lucarile lui Prota si Nicolaus arata ca cistenia poate fi incorporata chiar de insusi polimerul eumelanina, sulful contribuind la reducerea gradului de conjugare a polimerului intrat in molecula sub forma de dihidrobenzotiazilalanina.

Aceste observatii au conturat o noua opinie asupra compozitiei melaninei umane si anume melanina se formeaza printr-un fenome de copolimerizare cu proprietati intermediare intre polimerii eumelanici si feomelanici, adica contine produși de oxidare a dihidroxi-fenikakaninei (DOPA) si cisteinil-dihidroxifenialalninei (cisteinildopa) in diferite proportii.

Trichocromii sunt pigmenti inruditi cu feomelaninele, contin sulf in molecula lor si prezinta singurul grup dintre pigmentii melanici cu o structura bine definita. Sunt compusi cu o greutate moleculara mica. Au fost descoperiti acum 100 de ani in parul rosu uman si in penele rosii depui si datorita continutului ridicat de fier au fost numit initial trichosinderine. Denumirea aceasta a fost abandonata cand s-a constatat ca acesti pigmenti nu-si schimba culoarea atunci cand fierul este inlaturat din molecula lor. Asemanarea cu feomelanina apare si datorita gruparii de benzotiazilalanina. Structura trichocromilor a fost de mul studiată in ultimii 10 ani si pe langa principalii trichicromi B si C au mai fost izolati din penele rosii de pui alti 2 trichocromi E si F.

III.3.2. Procesul chimic al melanogenezei

Formarea melaninei prin oxidarea enzimatica a tirozinei a fost studiată de catre Raper. El a descoperit ca intre tirozina si produsul final , melanina, exista alte 3 substante intermediare si anume: 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), 5,4-dihidroxiindolul si acidul 5.6-dihidroxiindol-2-

carboxilic, elucidand astfel, inca din anul 1928, bazele chimice ale biosintezei melanina. Mai tarziu, Mason a studiat compusii din punct de vedere spectroscopic si aceste studii combinate au dus la conceptul de melanogeneza descris adesea sub forma schemei Raper-Mason. Tirozinaza, o enzima bogata in Cu, este necesara pentru activitatea ei bifunctionala pentru a cataliza in primul rand hidroxilarea tirozinei si transformarea ei in DOPA.

Pana in 1929 se cunoastea procesul de oxidare a DOPA cu formare de melanina si tehnica histochimica care se foloseste si astazi pentru punerea in evidenta a DOPA-oxidazei. Dar abia 20 de ani mai tarziu, Lerner si col. au demonstrat ca DOPA-oxidaza si tirozinaza sunt identice si ca oxidarea tirozinei de catre tirozinaza necesita anumeni cantitati catalitice de DOPA.

Cei mai multi cercetatori au presupus ca dupa primele 2 reactii care au loc datorita unei enzime, restul etapelor care duc la formarea melaninei se produc in mod spontan. Ulterior s-a semnalat un factor sau chiar mai multi factori cu actiunea inhibitoare asupra cresterii celulelor melanice in culturi, factori care sunt precursorsi ai melaninei, determina moartea celulelor melanice intr-un mediu care contine cantitati mari de tirozina (5mM), in timp ce celulele amelanotice sufera numai o incetinire a ritmului de crestere. Cercetari recente ale lui Pawelek si Korner pe culule de melanom de soarece Cloudman S 91, au pus in evidenta tre factori care controleaza sinteza melaninei.

1) Factorul de conversie a dopacromului (DCF dopachrome conversion factor), care accelereaza conversia dopacromului la 5,6-dihidroxiindol. DCF reactioneaza specific cu dopacromul neavand nici un efect asupra tirozinei sau dihidroxifenilalaninei. Acest factor a fost pus in evidenta la 2 lini de melanon de soarece (B16 Cloudman S 91), melanomul Green de hamster si la ciuperci. Ciupercile poseda un sistem de sintetizare a pigmentilor s-au dovedit a fi o sursa bogata in DFC, indicand astfel ca producerea biologica a acestui factor este larg raspandita in natura.

2) Factorul conversie a 5,6-dihidroxiindolului care catalizeaza conversia 5,6-dihidroxiindol la melanina si este actic numai cand celulele sunt expuse tratamentului cu melantropina (MSH); se presupune insa ca acest factor ar fi identic cu tirozinaza.

3) Factorul de blocare a 5,6-dihidroxiindolului care limiteaza melanogeneza la 5,6-dihidroxiindol, un produs toxic. Acest al treilea factor protejeaza celulele de efectele citotoxice ale precursorilor melaninei si actiunea inhibitoare poate fi inlaturata prin tratarea celulelor cu

MSH. S-a observat ca in culturile de celule nepigmentate de melanom sunt cantitati mari de factori blocanti in timp ce celulele pigmentate au cantitati mari de factori de conversie indolica. trecerea de la factorul blocare la factorul conversie este stimulata prin adaugarea de MSH.

III.3.3. Transferul granulelor de melanina

Odata formate, granulele de melanina, acestea se acumuleaza in melanocite si apoi sunt transferate celulelor inconjuratoare. Reprezentarea mecanismului de transfer al melaninei de la melanocite la keratinocite nu este unanim acceptata.

1. Dupa o conceptie mai veche s-ar parea ca melanocitele ar impropria melanozomii incarcate cu pigmenti in celule epiteliale. Masson numeste acest proces "citocrinie".

2. Dupa o alta conceptie, melanozomii sunt eliberati de dendrite in spatiul intercelular de unde sunt fagocitati de catre celulele epiteliale.

3. Teoria citofagitare sustine ca keratinocitele fagociteaza varful dendritelor melanocitelor, varfuri care sunt pline de melanozomi.

Acest proces de endocitoza a fost descris in detaliu pe baza observatiilor facute asupra interactiunilor *in vitro*, proces datorita caruia are loc fuziune directa a melanozomilor cu lizozomii din keratinocite formand "melanolizozomi" cu potential fotosensibil. Numarul matricelor de melanozomi din asemenea structuri este invers corelat cu marimea granulelor de melanina. La africani si la borigenii din Australia ca si la albi la care pielea a fost expusa la soare si la mogoloizi, melanozomii formeaza complexe. La indienii americani Kiowa sau Comanche, melanozomii sunt considerabili mai mari decat cei de la rasa alba si foarte apropiati de cei de la negroizi. Jimbow si Quevedo arata ca forma melanozomilor si densitatea lor sunt determinate genetic, cu toate ca se cunosc factori din mediul inconjurator care modifica temporar atat forma cat si distributia melanozomilor.

Distributia melanozomilor fiind determinata genetic, culoare pielii la cele 2 rase (alba si neagra) depinde in primul rand de melanocitele care produc granule de melanina si de keratinocite, care primesc si grupeaza aceste granule. amintim ca nuantele de culoare a pielii depin de cantitatea de melanina produsa de melanocite pe unitatea de suprafata epidermica, numarul lor fiind acealasi atat la albi cat si la negri.

III.3.4. Melanozomii și fosfataza acida

Structura melanozomilor este alcătuită dintr-o combinație de proteine structurale și enzimatice. Mult timp s-a considerat că activitatea enzimatică este reprezentată numai de tirozinaze. Studii citochimice recente au arătat că pe lângă tirozinaza, melanozomii mai conțin fosfataza acida și ATP-aza. Folosindu-se epitelul pigmentar retinian de la embrionul de pui, s-a demonstrat că fosfataza acida a fost detectată în melanozom numai când s-a ajuns la o melanizare completă și nu în faza ei incipientă. Mai mult, s-a constatat că există o relație inversă între activitatea tirozinazei și cea a fosfatazei acide în melanozomi. Această enzimă a fost pusă în evidență și în melanozomii din melanocitele umane normale. Faptul că fosfataza acida este incorporată preferențial în stadiile târzii ale melanogenezei se potrivește cu rolul posibil al acestei enzime în degradarea sau transferul melanozomilor și nu că ar fi un component esențial al procesului timpuriu de melanizare. Melanina ajunsă în keratinocite este astfel degradată în timp de către enzime lizozomale, iar matricea proteică a granulelor poate fi hidrolizată. Pigmentul din celulele epiteliale, în ultima lui fază, este îndepărtat din piele prin descuamare.

III.3.5. Alte tipuri de celule producătoare de melanozomi

În afară de melanocite mai sunt încă 3 tipuri de celule capabile să producă

Melanozomi: epitelul pigmentar retinian, oocitele vertebratelor și celulele Kupffer din ficatul amfibienelor.

(a) **Melanozomii din epitelul pigmentar retinian au fost studiați cu ajutorul microscopului** electronic la diferite specii de animale. În special la embrionul de pui s-au observat transformările membranei pre-melanozomilor în timpul melanogenezei sau structura fină a matricei eumelanozomilor, atât în situațiile normale, cât și în cazul unei pigmentări incomplete.

(b) Oocitele și celula-ou (zigotul) de la nevertebratele și vertebratele inferioare au fost intens cercetate la formele obișnuite în comparație cu cele mutante hiperpigmentate și albinoase. Deși caracteristicile funcțiilor sintetice ale oocitelor nu sunt pe deplin elucidate se știe că una din substanțele produse de oocit în timpul oogenezei este chiar pigmentul melanic format exclusiv în melanozom. Experiențele pe oocitele de axolotl au arătat că melanozomii complet pigmentați sunt localizați în citoplasma periferică a oocitului din stadiul 2 de dezvoltare. Melanozomii maturi sunt prezenți în oocitele din stadiul 3 și numărul lor crește constant atingând

un nivel maximum in oocitele din stadiul 6 de dezvoltare. Activitatea tirozinazei este foarte scazuta in oocitele din stadiu 1 si 2, atinge punctul maxim in oocitele din stadiul 3 si tinde spre 0 in oocitele din stadiul 6, cand melanozomii sunt incarcati cu pigment melanic, situatie identica cu cea din melanocite. Experientele lui Harsa-King(1980) reprezinta o confirmare a presupunerilor lui Verne facute in 1926 si anume ca pigmentul melanic care se gaseste in celula-ou (zigot) de la nevertebrate si vertebrate inferioare nu se formeaza chiar in ou, ci este adus in code catre elementele mezodermice precum melanoblastele stromei ovariene la broasca.

(c) Inca de la sfarsitul secolului trecut, diferiti autori au descris aglomerari de celule care contin pigmenti negru-brun in ficatul amfibienelor si reptilelor, pigmentul care este un constituint normal al acestui organ. Mult timp s-a crezut ca acest pigment melanic sintetizat in alta parte este fagocitat de celulele Kupffer si inmagazinat in ficat. Recent, Cicero si col., au demonstrat ca celulele Kupffer din ficatul broastei *Rana esculenta L.* sunt capabile sa sintetizeze melanina de tip indolic, nu sa o fagociteze, aceste celule trebuind sa fie incluse in sistemul pigmentar extracutanat.

III.4. Factori care determină melanogeneza

III.4.1 -Radiatia ultravioletă

Razele ultraviolete stimuleaza sinteza de melanina determinand innegrirea pielii. Cantitatea mai mare de pigment melanic asigura o protectie a pielii impotriva actiunii indelungate a radiatiilor solare. Inca din 1926, Verne a aratat ca lumina solara are actiune directa in formarea melaninei. Astfel, el a constatat existenta tirozinazei in tesuturile batracianului *Proteus* care traieste in apele din interiorul intunecos al unor pesteri din Iugoslavia. In aceasta stare este complet decolorat. Daca animalul este scos la lumina, celulele din epiderm incep sa secrete melanina dand culoare animalului. Deasemenea, a aratat ca la crustaceele decapode tirozinaza este localizata in regiunile tegumentare putemic luminate, singurele zone unde se formeaza melanina, cu toate ca melanocitele sunt prezente peste tot. In conformitate cu teoria lui Morpurgo, melanogeneza care urmeaza iradierii cu UV implica un complex de fenomene care se desfasoara in 5 etape:

1) distrugerea ADN din melanocite si inducerea unui sistem de refacere concomitent cu sinteza de receptori pentru MSH(hormonul melanocito-stimulator);

- 2) cresterea concentratiei de MSH;
- 3) stimularea activitatii tirozinazei datorita MSH;
- 4) sinteza de noi molecule de tirozinaza;
- 5) multiplicarea melanocitelor.

Procesele fotobiologice implicate in melanogeneza dupa expunerea la lumina ultravioleta au fost cercetate experimental la soareci adulti C57B1 prin tehnicicitochimice, histochimice si de autoradiografie a incorporarii timidinei. Aceste procese s-au manifestat prin patru stadii de reactii celulare:

a. initial, o perioada latentă in activarea celulelor precursore melanocitelor, cu dezvoltarea cisternelor Golgi si a reticulului endoplasmatic rugos urmate de formarea melanozomilor nemelanizati (primele doua zile); ulterioara de melanozomi melanizati (zilele 3-5) exponentiala de noi melanocite (zilele 6-7);

b. sinteza tirozinazei active care se acumuleaza in sisteme Golgi cu fomagere;

c. proliferarea mitotica a multor din aceste celule activate, urmata de o crestere;

d. transferul de melanozomi cu diferentierea filamentelor de filamente si ramificati ale dendritelor, dar fara vreo schimbare semnificativa in populatia de melanocite (ailele 8-14).

Alte cercetari la soareci au aratat ca razele UV determina cresterea putenica a numarului de melanocite epidermice DOPA-pozitive atunci cand soarecii sunt iradiati in anumite portiuni cu UV timp de 6 zile, incepand cu ziua a 16-a post-partum: in ziua a 16-a s-au numarat circa 50 melanocite/mm², pentru ea in ziua a 22 a numarul lor si creasca la o medie de 500/mm². In acelasi timp in zonole neiradiate ale oorpului soarecilor, numarul melanocitelor ramase si in zlu a 22-a de Girca 50/mm² Rosdahl a demonstrat existenta activitatif mitotice in melanocitele producatoare de pigment, neiradiate cu UV si a constatat ca acesto celule manifeste o activitate mitotiea crescuta la iradierea cu UV. Aceste dovezi experimentale confirma ipotezele dupa care epiderma soarecilor adulti negri contine o populatie fixa de melanocite precursore si arata ca melanogeneza dupa expunerea la razele UV implica atat activarea cat si proliferarea acestor celule.

III.4.2. Factorul endocrin

Hormonul melanocito-stimulator, MSH sau melanotropina, joaca un rol cheie in controlul producerii de pigment melanolic. La vertebratele superioare acest hormon este produs de lobul anterior al hipofizei, iar la batracieni si reptile MSH este secretat si de lobul intermediar, de unde si denumirea de intermediar. Extirparea hipofizei la mormolocii de broasca a avut ca rezultat o puternica contractie a celulelor pigmentare si deschiderea culorii tegumentului, aceasta culoare argintie ramanand si la broasca ce se formeaza din mormoloc. Daca mormolocii sunt introdusi intr-o solutie de extract de pituitar, culoarea se intensifica si in decurs de 15-30 de minute se ajunge la culoarea initiala neagra.

Melanotropina este formata din 2 peptide: alfa MSH (α -MSH) si beta MSH (β -MSH) izolate de Lee si Lerner in 1961 din adenohipofiza de maimute. Recent a fost identificata o noua peptida, gamma MSH (γ -MSH) prezisa din secventa genica, prin studii atat de hipofiza de bovine cat si pe lobul intermediar al larvei de *Xenopus laevis*. S-a observat ca α -MSH este specific fiecarei specii. Exista insa autori care nu erata ca β -MSH la om nu este decat un artefact de extractie si ca ceea ce s-a pus in evidenta ca β -MSH sunt de fapt beta- sau gamma-lipotrofine. In ultimul timp au fost cercetate toate formele de MSH (α , β si γ -MSH) ca si peptidele inrudite cu MSH la toate grupele de animale, pornind de la mamifere si pana la selacieni (rechini) care este cel mai vechi grup de pesti din punct de vedere filogenetic.

Molecula de α -MSH este identica cu primii 13 aminoacizi din molecula ACTH, produs de asemenea, de catre adenohipofiza. Din cauza corespondentei secventelor de aminoacizi, chiar hormonul ACTH are o actiune similara de innegrire a pielii. Se presupune ca ACTH produce o hiperpigmentatie lenta, evolutiva a tegumentelor in timp ce α -MSH accelereaza pigmentatia.

In adenohipofiza omului adult se produc cantitati foarte mici de α -MSH, lucru constatat prin masuratori imunoreactive ale α -MSH in plasma oamenilor sanatosi. La femeile gravide insa, s-au masurat cantitati mai mari de α -MSH. Autorii au presupus ca numai hipofiza fatului ar putea produce cantitati asa mari de α -MSH, dar este putin probabil ca molecula substantei sa treaca bariera placentara. Analizand placenta au vazut ca aceasta produce cantitati mari de ACTH care ar putea fi o sursa de α -MSH in graviditate datorita similitudinii primilor 13 aminoacizi. Totusi, rolul α -MSH in pigmentarea pielii in timpul graviditatii nu este lamurit.

La vertebrele inferioare, culoarea tegumentului lor se poate schimba și datorită mecanismului de control exercitat de α -MSH. La broasca *Xenopus laevis* atât *in vivo* cât și *in vitro*, în culturi de melanotoni, α -MSH determină dispersarea pigmentului în celule. Studii pe celulele pigmentare la amfibieni arată că cele trei tipuri de cromatofori ale acestora reacționează diferit la acțiunea MSH: *melanoforii*, care conțin melanozomi care se dispersază la adăugarea de MSH; *iridoforii*, care conțin placute reflectante care se contractă prin aceeași stimulare hormonală și *xantoforii*, care conțin pterinozomi și vezicule carotenoidice care nu reacționează în nici un fel la MSH.

La soarecii nou născuți, α -MSH poate acționa în mod normal stimulând diferențierea melanoblastelor în melanocite prin inducerea activității tirozinazei, formarea de melanozomi și puternică ramificație a dendritelor. La sobolani sinteza de α -MSH și β -MSH s-a produs aproximativ în jurul zilei a 19-a de gestație.

Studiul mecanismului acțiunii MSH pe mel: nocitele de mamifere a progresat mult prin experiențele pe celulele de melanom de soarece Cloudman S 91 și melanom B 16 cultura. Cel mai important efect obținut prin expunerea celulelor melanice la MSH este creșterea substanțială a concentrației de adozin 3 și 5'-monofosfat ciclic (cAMP). Câteva ore mai târziu are loc o creștere în activitatea tirozinazei ceea ce determină o intensificare a melanogenezei, schimbări în morfologia celulei și în rata de proliferare. Efecte similare cu acțiunea MSH se obțin dacă adăugăm în cultura AMPciclic. S-a constatat astfel că cAMP este mediatorul intracelular al hormonului melanocito-stimulator care induce activitatea tirozinazei și deci melanogeneza. Deoarece singurul mecanism cunoscut prin care AMP ciclic își exercită acțiunea sa fiziologică este activitatea proteinkinazei, se presupune că fosforilarea și defosforilarea proteinelor specifice este mecanismul prin care MSH determină intensificarea activității tirozinazei.

Recent, a fost pusă la punct o metodă pentru proliferarea melanocitelor umane normale *in vitro*, făcându-se astfel posibil controlul tirozinazei sub acțiunea MSH în melanocitele umane normale în comparație cu răspunsul celulelor de melanom de soarece și de om. Activitatea tirozinazei din celulele de melanom de soarece este crescută de 5 ori de către MSH, spre deosebire de melanocitele umane normale sau celulele de melanom uman care nu sunt sensibile și nu reacționează la acest hormon, indiferent dacă activitatea tirozinazei este intensă sau scăzută. Se crede că lipsa de răspuns la MSH în melanocitele umane normale și maligne se datorește legării

unui numar insuficient demolecule de hormon. De asemenea, se crede ca procesele cunoscute ca fiind in legaturacu stimularea melanizarii prin adaugarea de MSH in melanoamele de soarece, precumactivarea adenilat ciclazei sau activitatea protein-kinazei, lipsesc in melanocitele umane normale.

Toate celulele care prolifereaza trec prin anumite stadii care constituie ciclul mitotic.

Investigand particularitatile raspunsului la MSH pe celulele de melanom de soarece s-aobservat ca cresterea nivelului de AMP ciclic si a activitatii tirozinazei se produce infaza G2 a ciclului celular. Pentru ca raspunsul sa fie corect celulele au fost sincronizate prin tratare cu 0,015 μ g/ml colchicina si dupa 36 de ore aproape toate celulele au ajunsin metafaza. Varga si col. au dovedit de ce celulele de melanom raspund raspund la MSHnumai in faza G2. Folosind MSH marcat cu 125 I, au gasit ca celulele sunt capabile sa legehormonul de membranele lor numai in faza G2, in faza G1 si S se leaga o cantitate foartemica de hormon sau deloc, receptorii pentru MSHH find disponibili numai in G2. Astfel, G2 cresterea mediata de MSH a concentratiei de AMP ciclic este restransa la faza deoarece numai acum este momentul cand hormonul poate sa prinda celule stimuleze adenil-ciclaza legata de membrana. Crescand concetratia de cAMP are loc o stimulare a activitatii tirozinazeisi deci o crestere a cantitatii de melatoninina in celule. Totusi Fuller si col gaseste ca receptorii de membrana in MSH sunt prezenti in tot timpul ciclului celular.

Un alt hormon care este antagonist ca actiune melanotropinei si este secretat de celulele epifizei (pinealocite) este melatoninina. Din punct de vedere chimic melatoninae inrudeste cu serotonina, aceasta fiind o veriga in lantul de biosinteza a melatonineidin L-triptofan. Prima etapa a biosintezei melatoninei are loc in membrana mitocondriala apinealocitelor unde triptofanul este hidroxilat in 5-hidroxitriptofan si prin decarboxilare se obtine 5-hidroxitriptamina sau serotonina. Serotonina este convertita in N-acetilserotonina prin actiunea enzimei N-acetiltransferaza (NAT), proces care costituie o a doua etapa spre sinteza melatoninei. In ultima etapa N-acetilserotonina se transforma cu ajutorul enzimei hidroxiindol-O-metiltransferaza (HOMT) in melatoninina.

Reglarea sintezei melatoninei se datoreste noradrenalinei care sintetizeaza lanivelul neuronilor sistemului nervos simpatic. Noradrenalina stimuleaza receptorii betaadrenergici ai pinealocitelor, intensifica activitatea adenilat ciclazei si determinacresterea nivelului intracelular

de adenozi 3',5'-monofosfat (cAMP). Acesta faciliteaza sinteza enzimei N-acetiltransferaza (NAT) si deci a melatoninei. Melatonina a fost identificata de Lerner in 1958 in epifiza de vitel si cativa ani mai tarziu s-a dovedit a fi un hormon. Mult timp s-a stiut ca este un produs exclusiv al glandei pineale, dar cercetari recente la diferite vertebrate (sobolan, pui, peste) au demonstrat ca melatonina mai este sintetizata de catre retina si de glanda harderiana. Actiunea melatoninei a fost constatata prin efectul sau asupra culorii pielii pestilor si amfibienilor, fiind mult mai activa decat noradrenalina in deschiderea culorii acestor animale. Datorita acestei actiuni melatonina a mai primit denumirea de "principiul de contractare a melanocitelor" sau

"substanta care albete melanocitele". S-a urmarit de asemenea influenta melatoninei si a precursorilor ei asupra celulelor pigmentare de la planarii experimentandu-se modul in care se produce contractia celulelor pigmentare fata de melatonina care este un hormonal vertebratelor, fata de serotonina care este omniprezenta in lumea vie si fatatreptamina care reprezinta "molecula ancestrala" pentru amandoua.

In culturi de melanocite ale foliculului de par de la mamifere, adaugarea de melatonina inhiba sinteza de melanina, avand un efect opus hormonului melanocitostimulator. Acelasi efect inhibitor il are si guanozinnofosfatul ciclic (GMP ciclic). Observandu-se interactiunea dintre hormoni si nucleotide, s-a ajuns la ideea unui dublu control melanogenezei: MSH activeaza sinteza de melanina prin cresterea AMP ciclic iar melatonina inhiba sinteza de melanina actionand similar cu GMP ciclic. Totusi, lucrurile nu pot fi explicate usor deoarece efectul melatoninei asupra culturilor de melanoci este același cu efectul in vivo la mamifere. Mai clar, se pare ca melatonina nu are nici un rol in reglarea culorii pielii la mamiferele in vivo. Bagnara (1964) arata ca melatonina este secretata ca raspuns la schimbarile luminozitatii mediului inconjurator si in competitie cu hormonii melanocito-stimulatori hipofizari, avand un mare rol in ritmul circadian al vertebratelor si in ritmul sezonier la mamifere.

III.4.3. Factorul genetic

In anul 1927 s-a descoperit ca melanoamele pot fi produse experimental prin hibridarea anumitor specii de pesti, originare din raurile Americii Centrale. Acesti pesti, vreo 8 specii diferite, apartin genului *Xiphophorus*, cele mai cunoscute specii folosite in hibridari fiind *X. maculatus* si *X. helleri*. Cauzele formarii spontane de melanoame la pestii hibridi au fost studiate de Gordon in Statele Unite si Kosawig in Germania. Ei au aratat ca exista un

factor mendelian in linkaj cu cromozomul soxual, o gena specificadonumita „gena macromelanofora” de catre Gordon sau gena pigmentului de catre Kosswig. Aceasta gena macromelanofora este responsabila de producerea unei celule pigmentare de dimensiuni mari (peste 500µm in diametru) care sintetizeaza pigmentmelanic si care se numeste macromelanofor. Macromelanoforii se formeaza la hibridi printre celule pigmentare normale si dau nastere la tumori ale celulelor pigmentare saumelanoame, similare celor de la soareci sau om.S-a constatat astfel ca tumorile melanice sunt expuse si unui control genetic, experientele constituind un adevarat model genetic pentru carcinogeneza.

Mai tarziu, la mamifere au fost catalogate peste 130 de mutatii diferite ale culorii blanurilor, mutatii apartinand la circa 50 de locusuri genetice. Cele mai cunoscute sunt 6serii principale de alele multiple: A (agouti), B (brown), C (albino), D (dilute), B (extension) si P (pink-eyed). Locusul agouti sau A reprezinta un model foarte interesant pentru controlul sintezei

de eumelanina si feomelanina Locusul A este un complex de cateva gene si pana acum au fost descoperite 17 alele distincte ale acestui locus de pe cromozomul 2 la soarece. Animalele cu gena agouti (soareci, pisici, vulpi) au firele de par din blana cubenzi de culoare deschisa si benzi de culoare inchisa ca rezultat al intreruperii sintezede feomelanina galbena si trecerea la sinteza de cu melanina brma sau neagra, fenomencare se petrece simultan la fiecare fir de par in timpul ciclului de crestere. Animalele non-agouti nu trec prin aceasta intrerupere ciclica a sintezei de pigmenti si ca atare culoarea lor este in intregima bruna, neagra sau galbena. Accasta schimbare ciclica asintzei de feomelanina in eumelanina este sub contolul MSH. Soarecele normal sau

tipul salbatic prezinta coloratie agouti avand firele de par in benzi periodice de doua culori. Soarecii non-agouti poarta mutatii pentru o singura culoare cum este cea neagrasau galbena. Soarecele galben prezinta o mutatie numita „lethal yellow” si se gseste in locusul agouti fiind dominata de alte 16 alele ale aceluiasi locus. In forma sahomozigota, mutatia este letala datorita faptului ca oul fertilizat nu se poate implanta in peretele uterin. In stare heterozigota animalele supravietuiesc, dar configuratia in benzia firelor de par se pierde, culoarea lor fiind numai galbena. In plus indivizii heterozigotidevin obezi, au diabet si o mare tendinta spre formarea de tumori spontane.

Actiunea alelelor seriei agouti (Ay, Aw, At, a, ae, at) este modificata de genele locusului E (extension) cu actiune clara in melanocite. Alelele dominante care extind pigmentatia neagra,

diminueaza intrarea compusilor sulfhidril in mediul inconjurator si astfel reduc cantitatea de feomelanina formata de melanocit.

Locusul C (albino) contine gena care determina structura tirozinazei fie ca are numai actiune reglatoare pentru enzima. S-a apreciat ca albinosi care sunt homozigoticu alelelerecesive, cc, apar in populatia umana cu o frecventa 1: 20.000. Melanocitele sunt prezente in pielea albinosilor, dar la unii albinosi tirozinaza lipseste complet. Structura melanozomilor este defectuoasa. Studiindu-se o colectie de biopsiei de piele la peste 200 de pacienti, au fost identificate cel putin 7 forme diferite de albinism bazate pe activitatea tirozinazei. Acest proces poate fi difuz cuprinzand toata pielea, parul si ochii(cu dereglarea sistemului vizual central) sau poate fi localizat numai la cateva zone ca in cazul albinismului partial (picbaldism). Piebaldismul, care se transmite cu o mare precizie de la o generatie la alta, ne arata ca defectul genetic este limitat numai la un grup specific de precursori ai melanocitelor care migreaza in timpul dezvoltarii embrionare din crestele neurale spre locurile periferice.

III.5. Melanocitele în culturi. Ciclul celular

Melanocitul se prezinta in cultura ca o celula diferentiata cu markeri ultrastructurali si biochimici bine definiti melanozomii si tirozinaza. Cultura de lunga durata amelanocitelor umane s-a dovedit extrem de dificila in primul rand perioadei lente dededublare a populatiei de celule si in al doilea rand datorita prezentei celulelor carecresc mai repede decat melanocitele si keratinocitele.

La inceput, melanocitele umane au fost observate in culturile de piele alaturi de celelalte tipuri de celule si abia in 1957, Hue si col. au trecut excusiv la cultura demelanocite umane tot din piele. Multa vreme cercetatorii nu au reusit sa mentina in vitrocelulele pigmentare normale umane. In general acestea supravietuiesc in culturi numai operioada scurta, de circa 5-6 saptamani. Initial, celulele melanice isi mentin formadendritica obisnuita precum si pigmentul, dar pe masura invecirii cultrii numaruldendritelor scade, celulele isi iau o configuratie hipolara si isi pierd pigmentul. Dupacateva saptamani fibroblastele invadeaza culturile si melanocitele dispar. Paralel s-auefectuat culturi de melanocite din piele de soarece si mai ales de cobai. Aceste culturi au dat rezultate foarte bune, celulele pigmentare divizandu-se regulat chiar daca rata de proliferare a acelorasi celule in vivo este scazuta. Numarul maxim de diviziuni consecutive a fost

de 26, iar celulele-fiice rezultate au continuat safunctioneze normal. De asemenea, au dat rezultate bune culturile de melanocite obtinutedin melanoamele maligne umane.

Cultura de melanocite implica 3 mari probleme:

1. separarea celulelor epidermului
2. purificarea culturii de melanocite
3. mentinerea melanocitelor in cultura de lunga durata.

Primul pas in izolarea melanocitelor este separarea epidermului de derm pentru a se reduce astfel riscul contaminari cu fibroblaste. Aceasta se face obisnuit pe caleenzimatica cu colageneza sau tripsinaUrmatorul pas este purificarea culturii prin eliminare keratinocitelor. Wilkins siSzabo au produs culturi de melanocite cu o punctate de circa 95% folosind anumite

cantitati de micostatin care inhiba adeziunea keratinocitelor. Riley a aplicat un curentgazos format din 95% oxígensi 5% CO₂ peste o cultura mixta de melanocitekeratinocite si a obtinut o cultura aproape numai din melanocite din cauza ca celulele pigmentare au o deosebit de mare rezistenta la presiunea oxigenului spre deosebire de celulele epidermice.

Tsuji si Karasek arata ca in prezenta concentratiilor scazute de 5-fluorouracil (5-FU), kartinocitele sunt distruse in primele 3 saptamani in timp ce melanocitele continuau sa se multiplieze si sa formeze pigment.

Eisinger si Marko au pus la punct pentru prima data o metoda prin care se obtin culturi aproape pure de melanocite normale umane pe timp indelungat (cca. 8 luni), folosind mediul de cultura 10 ng/ml de ostor forbolic ai 10 nM toxina holerlea. Baterul forbolic (12-miristat-13-acetatforbolic PMA) are un efeot toxio asupra keratinoitelor, favorizand totodata aderenta si proliferarea melanocitelor, in timp oe toxina holeriea inhiba cresterea fibroblastelor. In aceste conditii, melanoaitele umane pot fi obtinute prin pasaje succesive in vitro si crescute in cantitati maro necesare diforitelor experiente Astfel, in cultura de melanocite umane normale si maligne s-a studiat efectul hormonului melanocito-stimulator (MSH), actiunea cAMP sau ditiburi cAMP, a diversilor esteri forbolici, a diferitelor substante care favorizeaza cresterea tumerala (teleocidin, aplysiatoxin) sau a unor factori de crestere ca: factorul de crestere al celulelor nervoase, factorul de crestere a fibroblastelor, factorul de crestere a celulelor epidermice, factorul de crestere tumoral sau factorul de crestere a melanocitelor extrase din creierul de bovine. Unele substante au o actiune stimulatorie iar altele nu au nici un efect asupra ratei de proliferare celulara sau asupra

ciclului celular. Cinetica proliferării celulare este importantă atunci când se urmărește răspunsul tumorilor la radioterapie sau chimioterapie, deoarece sensibilitatea celulară este dependentă de ciclul celular. Melanocitele umane normale cresc relativ încet având un timp de dedublare de aproximativ 96 ore.

Timpul de dedublare a melanocitelor maligne diferă de la autor la autor. Lamerton arată că perioada intermitotică la melanoamele maligne umane este de 120 -140 de ore față de 20 de ore la ascita L-1210 și 50 de ore. În adenocarcinomul primar la sobolan. Fuller găsește ciclul celular de 24 de ore la celulele de melanom. Claudman S91 la soarece, lungimea fazelor ciclului fiind: 10 ore G₁, 8 ore-S, 2 ore-G₂ și 4 ore-M.

CAPITOLUL IV

MORFOLOGIA MELANOCITELOR DIN PROLIFERĂRILE MALIGNNE

Dupa Mishima se deosebesc doua tipuri de melanoame maligne:

nevocitice si melanociti-ce, separare care nu mai este azi unanim admisa. Elementul celular din melanomul malign nevocitic ar avea o forma curboidala sau alungita si o cantitate variabila de pigment intracitoplasmatic.

Mitozele par a fi relativ rare, ca si monstruoziatilitate nucleocitoplasmatic. Electrono optic, melanozomii ar prezenta particularități distinctive de elemente de origine melanocitică.

Melanoamele maligne melanocitice cutanate au fost impartite de McGovern în trei forme diferite din punct de vedere histologic, clinic si biologic: melanomul malign de tip lentigo, melanomul malign cu extensie superficiala si melanomul malign nodular.

Cercetari recente introduc o a patra forma, denumita melanom lentigo acral cu localizare stricta in regiunile anatomice acrale.

Studiile de microscopie electronică au arătat existența unor diferente morfologice între caracterele celulelor aparținând celor trei forme de melanoame, dar și o mare varietate de aspecte histologice ale celulelor aceleiași tumori. Luând în context aspecte histopatologice comune ale nucleilor, melanozomilor si mitocondriilor, Clark a clasificat celulele melanozomului malign în patru tipuri ultrastructurale:

- tipul I, caracterizat printr-o dezorganizare ultrastructurală redusă;
- tipul II si III prin modificari electrono optice accentuate;
- tipul IV, cu celule complet dezorganizate, care au pierdut orice asemănare cu melanocitele normale.

Se pare că în melanomul malign cu extensie superficială predomina celule de tip II si III, în forma nodulară se găsesc în special celule nediferentiate, de tip IV, în timp ce in lentigo malign ar fi celule de tip I. Clark și col. susțin că în lentigo malign unele melanocite apar aproape normale, altele ar avea nuclei mari, suprafata plicaturata, dar ar elabora melanozomi in mod

normal. Ceea ce ar diferi, ar fi transferul granulelor la keratinocite, in loc de 2-3 fiind cedati 10-15 melanozomi. In melanomul malign cu extensie superficiala celulele ar contine melanozomi anormali in peste 50% din citoplasma, granulele avand o melanizare incompleta si, ca urmare, pigmentul din keratinocitele adiacente ar fi anormal. Prin analogie, FOA arata ca tipul I celular contine intracitoplasmatic melanozomi fibrilari melanizati, tipul II melanozomi

fibrilari nemelanizati, celulele fiind mai putin pigmentate, tipul III melanozomi granulari abortivi, tipul IV nu contine decat figuri mielinice. Melanocitele acromice ar apartine tipului IV sau chiar unui tip V, caracterizat prin structuri particulare „in retea”.

Modificarile generale electronoptice ale melanocitelor maligne includ cresterea raportului nucleo-citoplasmatic, contur nuclear neregulat nucleoli mari si multipli. Citoplasma contine o hiperplazie si o hipertrofie a mitocondriilor, uneori atipii mitocondriale, reticul endoplasmatic rugos, ca si aparat Golgi foarte dezvoltat. Ribozomii liberi si

poliribozomii sunt in numar crescut ocupand un mare teritoriu citoplasmatic.

Melanocitele maligne produc melanozomi cu structura normala sau modificata, de aspect fibrilar, granular sau vezicular, gradul, ca si modul de melanizare, variind foarte

mult. Acest fapt determina aparitia unor aspecte foarte diferite in structura, dar si in localizarea granulelor de melanina, uneori chiar si in aceeasi celula. Numarul melanozomilor

variaza in functie de ciclul biologic al fiecarei celule. La tumorile apigmentare se gasesc granule in melanocitele maligne, acestea aparand sub forma de premelanozomi, cu reduse aspecte de melanizare. Studiul morfologic al melanozomilor ar permite identificarea celulelor de aspect similar, care apartin aceleiasi clone celulare, in cadrul unei tumori adesea aparand doua sau trei clone de celule. In schimb, nu se deceleaza modificari caracteristice unui singur tip de melanom: nodular, cu extensie in suprafata sau chiar metastaza de melanom.

Numeroase organite ce se gasesc in melanocitele maligne, ca si numarul ridicat de melanozomi cu structura abordiva, ingreuneaza mult studiul citoscheletului. Se pare ca sistemul microtubular nu ar fi, in general, modificat in celula tumorală. S-au descris

totusi ingramadiri spre suprafata sau spre o zona profunda a celulei, ca si aglomerari in prelungiri. Oricum, nu exista o dispozitie, o directie sau un numar specific

al microtubulilor care sa caracterizeze celulele neoplazice ale melanoamelor sau gradul lor de malignitate.

Microfilamentele variaza cantitativ, uneori mai abundente, grupate in manunchiuri, alteori putine, cu dispozitie laxa. Kanzaki si Hashimoto descriu doua varietati de microfilamente-unele subtiri de 6 nanometri, cu dispozitie submembranara, altele groase, de 10 nanometri, in jurul nucleului si a organitelor celulare, cresterea microfilamentelor invers corelata cu gradul de diferentiere a celulei. Lipsa de aranjare ar corespunde unui comportament malign, in timp ce reducerea functionalitatii sistemului microfilametar ar avea rol in expriamrea comportamentului antigenic.

Sistemul citoscheletal ar mai avea rol in formarea structurilor celulare de suprafata (vezicule, microvili si falduri de retractie), proprietatile antigenice; ca si cresterea exploziva si necontrolata a celulei maligne fiind determinate si de ultrastructurile membranare.

In raport cu melanocitele normale, cele maligne sunt de 2-3 ori mai voluminoase, cu suprafata mult mai neregulata. Drzewiecki, intr-un studiu de microscopie electronica prin scanning remarca reducerea prelungirilor dendritice, ca si predominanta micrivililor, veziculelor si microveziculelor, pentru care imparte celulele in patru tipuri :

- tipul I- celule cu suprafata neteda;
- tipul II- celule avand la suprafata vezicule;
- tipul III- celule avand la suprafata microvezicule;
- tipul IV- celule avand la suprafata microvezicule, microvili si lamele.

Cele patru tipuri ultrastructurale de baleiaj ale melanocitelor maligne, descrise de Drzewiecki nu sunt superpozabile cu cele descrise de Clark prin microscopie electronica de transmisie. Studii pe culturi de celule arata ca morfologia suprafetelor celulare este dependenta de ciclul celular, de unde concluzia ca celulele in mitoză au foarte multe proiectii membranare. Se pare ca celulele care au suprafata marita, datorita extensiilor si neregularitatilor superficiale, sunt mai atractive si au un consum crescut de metaboliti.

Recente investigatii pe culturi celulare au aratat ca AMP-ciclic (cAMP) ar fi implicat, ca factor esential, atat in formarea microtubulilor din proteinele monomere, cat si in dispozitia lor

in celula. S-a constatat existenta unui paralelism intre cele doua elemente, prezenta submembranara si orientarea paralela a microtubulilor, determinand celulei o suprafata stabila. Continutul scazut in cAMP din celulele maligne explica suprafata lor neregulata. Un aport crescut in cAMP in cultura modifica suprafata celulelor maligne, in sensul unei normalizari.

In culturi, celulele de melanom malign iau forme particulare. FOA descrie morfologic patru tipuri celulare: fibroblastoide, epiteloide, dendritice si ascutite. Autoarea gaseste celulele cultivate in trei ipostaze:

- fie dintr-un acelasi fragment migreaza doua categorii de celule, unele pigmentare care dispar aparent, altele acromice, fibroblastoide care prolifereaza; la 2-4 luni de evolutie, insulele pigmentare se individualizeaza in sanul celor fibroblastoide care dispar treptat;

- fie dintr-un fragment pigmentat migreaza celule pigmentate care se stabilesc in linie;

- fie dintr-un fragment metastazic se formeaza doua linii stabile- una pigmentata, alta acroma.

In culturi de celule gradul de melanizare a melanozomilor este diferit, Organitele celulare sunt anormale, adesea gigante, iar in citoplasma se gasesc vacuole de autofagie. Aspectele ultrastructurale ale melanocitelor cultivate se suprapun, in general, peste modificarile celulelor din tumora. FOA descrie patru tipuri celulare: tipul I cu celule foarte melanizate; tipul II, cu premelanozomi fibrilari, in diferite stadii de melanizare; tipul III cu premelanozomi granulari si corpi concentrici; tipul IV cu corpi concentrici si structuri lamelare in absenta melanozomilor.

Modificarile citologice in sectiunile semifine ar fi identice cu cele observate la microscopia optica. Din punct de vedere ultrastructural, suprafata celulelor este in general neteda, celulele prezentand reduse protruzii de pseudopode sau microvili. Intre celule nu s-au evidentiat complexe jonctionale specializate.

Inracitoplasmatic se constata un aparat Golgi voluminos, cu numeroase vezicule. Reticulul endoplasmatic neted are cisternele dilatate, pline cu material granular. Reticulul endoplasmatic rugos prezinta tubi scurti, dispusi dezordonat, iar ribozomii liberi sunt rari. Mitocondriile sunt crescute numeric, raspandite in toata citoplasma. Nu toate celulele din cultura contin granule tipice de melanina. S-au mai gasit particule

dense lizozomale, picături lipidice și granule de glicogen în citoplasma. Nucleul nu prezintă o anumită polaritate în celulă, în raport cu poziția acesteia; are suprafața neregulată și nucleoli mari, proeminenți.

Toshima și col. au studiat culturi de celule provenite din melanoame cu melanocite producătoare de mari cantități de pigment melanic, în scopul de a surprinde modalitățile și etapele procesului de melanogeneză. Aspectele observate de autori în ultrastructura melanocitelor legate de mecanismul melanofomator sunt:

- lărgirea sistemului sacular, mai accentuată în aparatul Golgi, față de reticulul endoplasmatic;
- elaborarea veziculelor intermedii, conținând granule cu diametrul de 20-30 Å;
- maturarea veziculelor intermedii, cu acumularea unor conglomerate ce le umplu și le fac să ajungă la dimensiuni de 80-150 Å;
- realizarea structurilor fibrilare cu anumită periodicitate și formarea premelanozomilor;
- depozitarea melaninei pe structurile fibrilare până când concentrația acesteia face melanozomii electronopaci.

CAPITOLUL V

MORFOLOGIA MELANOAMELOR

V.I. Melanoamele cutanate benigne (nevii pigmentari)

Nevii pigmentari sau melanoamele benigne sunt mai curand anomalii de dezvoltare decat formatiuni neoplazice, care apar de obicei in primii ani de copilarie.

Macroscopic, se prezinta in general sub forma unor pete sau leziuni papilare pigmentate, de dimensiuni variabile, care rezulta din proliferarea melanocitelor. In consecinta, nevii se pot intalni in orice regiune corpului unde exista melanocite: piele, conjunctiva, tractul uveal si meninge.

O localizare neobisnuita este capsula ganglionilor limfatici, prezenta celulelor nevice fiind explicata in aceste cazuri printr-o migrare aberanta a melanocitelor.

La formarea nevului pot participa toti constituintii tegumentului, dar elementele celulare de baza sunt melanocitele intraepidermale, celulele Schwann si terminatiile nervoase din derm.

Microscopic nevii pot prezenta aspecte variate, in functie de varsta leziunii si regiunea anatomica care se dezvolta.

Se descriu urmatoarele tipuri de nevi:

V.I.1. Nevul intraepidermal

sau jonctiional este format din ciburi de melanocite situate exclusiv in epiderm, la nivelul zonei de jonctiune epidermo-dermala, de regula in varfurile crestelor interpapilare. Stratul bazal dintre cuiburi este normal sau poate contine melanocite mai numeroase decat in mod normal.

Cuiburile de melanocite din epiderm sunt separate de derm prin membrana bazala. Epidermul suprainiacent este normal, iar dermul este lipsit de infiltrat inflamator.

Celulele nevului jonctiional pot fi epitelioides sau fuziforme cu orientare orizontala si contin in mod caracteristic granule discrete de pigment.

Clinic, nevul jonctiional se prezinta sub forma unei leziuni maculare pigmentate de culoare bruna, neagra sau albasffuie, uneori bine circumscrisa, alteori cu margini slab conturate fata de tegumentul invecinat.

Nevul jonctional se intalneste mai ales la copii, mai rar la adulti la nivelul palmelor, plantei si scrotului.

V.I.2. Nevul displazic

este un nev mare atipic, cu potential ridicat de malignizare, care, dupa Elder si col., reprezinta o forma intermediara, intre nevul comun si melanomul malign.

Se poate prezenta sub doua forme: (a) *familiala*, in cadrul sindromului individualizat de Clark si col.in 1976 sub denumirea de „B.K. mole syndrome”, dupa initialele prenumelor primelor doua familii studiate, cu transmitere ereditara autozomaldominanta; (b) *sporadica*.

Ulterior ambele forme- au fost incluse in „*sindromul nevilui displazic*”, avand in vedere implicarea acestor leziuni in dezvoltarea melanomului malign.

Clinic, acesti nevi sunt morfologic atipici: contur neregulat, pigmentare variabila, cu o componenta maculara. Tipic dar nu invariabil, ei sunt mai mari (peste 5mm) si mai numerosi decat neviile castigate comune si pot sa apara in locuri neobisnuite pentru acestea, ca regiunea scalpului si glanda mamara, avand predilectie pentru regiunea fesiera si plicile inghinale.

Histologic, o caracteristica sine qua non este prezenta atipiilor nucleare ale melanocitelor, asociate cu o stroma- reactie limfocitara si/sau fibroblastica in dermul superficial.

Nevul displazic trebuie privit ca un nev oprit intr-un anumit stadiu de evolutie. Cand oprirea in dezvoltare se instaleaza timpuriu, apare nevul displazic intradermal. Daca oprirea in dezvoltare apare dupa o perioada de evolutie normala, leziunea cuprinde caractere morfologice atat ale nevilui comun castigat cat si ale nevilui displazic - nev displazic compus. Cele doua componente ale nevilui displazic compus pot fi identificate histologic si uneori clinic.

Microscopic leziunea este formata dintr-o portiune centrala cu aspect de nev compus obisnuit inconjurat de un „guler” de melanocite intraepidermale constituind portiunea displazica a leziunii. Prin urmare, pentru evidentierea modificarilor displazice este important sa se examineze periferia leziunii, uneori fiind necesare sectiuni seriata. Modificarile displazice se caracterizeaza printr-o proliferare continua, „lentiginoasa” de melanocite individuale care pot inlocui complet stratul bazal de cheratinocite si rare cuiburi de

celule nevice ovoide, cu axele lungi, paralele cu pielea, uneori situate între două creste epidermice adiacente.

Celulele proliferate sunt ceva mai mari decât melanocitele normale și conțin mai puțin pigment decât celulele din nevi joncționali mici. Alteori, se poate evidenția prezența unor celule mai mari, de tip epiteloid, cu citoplasma bogată și pigment intracitoplasmatic pulverulent, asemănătoare celor din melanomul malign, cu extensie superficială, care însă de obicei sunt limitate; a zona bazală a epidermului, fără migrare semnificativă pagetoidă în epiderm. Deși aspectele descrise mai sus permit suspiciunea de nev displazic, diagnosticul specific al acestei leziuni depinde de recunoașterea la mărirea mai puternică atipiilor nucleare semnificative în unele celule nevice. Proportia celulelor atipice în nevil displazic este de aproximativ 5% și ele sunt răspândite „la întâmplare” printre celulele nevice de aspect obișnuit. Atipiile din nevil displazic sunt asemănătoare celor întâlnite în leziunile displazice cu alte localizări. Ele se caracterizează prin creșterea volumului nuclear, hiperchromazie, neregularități ale membranei nucleare, modificări ale structurii cromatinice care apare grunjoasă, grosolană, prezența nucleolilor și a mitozelor, acestea din urmă întâlnindu-se în special la nivelul componentei intraepidermale a leziunii.

Gravitatea modificărilor displazice este reflectată în primul rând de proporția celulelor atipice, mai mult decât de aspectul celulelor individuale în sine. O proporție de peste 50% de nuclei atipici, ca și prezența mitozelor, ridică suspiciunea de melanom malign.

Combinarea atipiei nucleare cu modul de proliferare „primitiv”, lentiginos sau cu celule epiteloid, a fost denumită „displazie melanocitică”, termen utilizat cu aceeași semnificație ca și în alte sisteme de organe.

Reacția stromală prezentă în mod constant în nevil displazic este reprezentată de o infiltrație limfocitară în jurul vaselor din plexul superficial capilar venos, asociată cu o reacție fibroblastică ce poate îmbrăca două aspecte: (a) fibroza eozinofilă și (b) fibroplazia lamelară.

(a) Fibroza eozinofilă se prezintă sub forma unei benzi colagene, eozinofile compacte care înconjoară crestele epidermice alungite la joncțiunea epidemo-dermală;

(b) Fibroplazia lamelara consta din aglomerari de fibre colagene delicate si fibre de reticulina separand celulele fuziforme, toate extinzandu-se vertical in jos de la cuibul de melanocite la varful crestelor epidermice. Uneori, celulele fuziforme sunt pigmentate. Aceste caractere, ca si unele caracteristici ultrastructurale, sugereaza faptul ca ele sunt de fapt celule nevice care sufera diferentiere desmoplastica sau schwanniana, pe masura ce descind in derm.

V.2 Melanoamele cutanate maligne

V.2.1. Relația dintre nevi și melanoamele maligne

Asupra relatiei dintre nevi si melanoamele maligne au existat pareri controversate. Wright, in aproximativ 50% din cazuri melanoamele maligne rezulta in urma malignizarii unui nev, iar dupa Nichols, in cel putin o treime din cazurile de melanoame maligne a existat un nev in antecedente. Observatiile din ultimii ani au aratat ca doua categorii de nevi prezinta o predispozitie crescuta de malignizare: nevii congenitali si nevii displazici.

Dupa Kopf, nevii congenitali giganti (diam. peste 20 cm) au o rata medie de malignizare de 12%. Datele referitoare la potentialul de malignizare al nevilor congenitali de dimensiuni mai mici sunt pana in prezent insuficiente. Malignizarea nevilor congenitali giganti apare in majoritatea cazurilor inainte de pubertate, iar din punct de vedere histologic acestia sunt nevi jonctionali, nevi albastrii sau nevi cu elemente neuroide.

Nevii displazici se intalnesc la 2-5% din membrii populatiei normale si pot fi implicati in potogeneza a 30-50% din melanoamele maligne. Dupa date mai recente, proportia nevilor benigni implicati in dezvoltarea melanoamelor maligne cu extensie superficiala variaza intre 39% si 53%.

O serie de autori de prestigiu subliniaza importanta proliferarii epidermale in evolutia tuturor melanoamelor maligne, aceste tumori luand nastere prin proliferarea melanocitelor maligne epidermale sau din celulele situate in regiunile superficiale ale nevilui. Conform acestei concepii, un melanom malign nu se formeaza niciodata dintrun nev intradermal, ci componenta intradermala devine interesata numai prin infiltrarea cu celule din epiderm. Se pare insa ca aceasta afirmatie nu are valoare absoluta, deoarece au fost semnalate cateva cazuri sporadice de melanoame maligne cu origine in nevii intradermali.

V.2.2. Melanomul malign in situ

Teoretic, orice melanom malign incepe sub forma unei leziuni maculare inainte de a deveni Papula. In stadiul macular de evolutie a melanomului malign melanocitele neoplazice sunt limitate la epiderm si structurile epiteliale ale anexelor.

In ultimii ani s-a produs introducerea termenului de melanom malign in situ, prin analogie cu alte leziuni neoplazice intraepiteliale, pentru definirea unor leziuni care intrunesc caracteristicile citohistologice ale melanomului malign, limitate strict la epiderm, fara invazia dermului. Acest termen este preferabil altor denumiri utilizate de anamatoologii, ca de exemplu, nevil jonctional activ, melanoza premaligna, hiperplazie melanocitara atipica sau melanom incipient, deoarece reflecta mai fidel caracteristicile acestei leziuni. Celulele melanomului malign in situ sunt identice cu cele din melanomul malign invaziv, de care difera numai prin localizarea strict intraepidermala, iar comportamentul este asemanator cu al carcinoamelor in situ cu alte localizari. Melanomul malign in situ poate deveni invaziv, se poate mentine stationar mai multi ani sau poate regresa.

Clinic prezinta o serie de caracteristici pe baza carora poate fi recunoscut de clinicienii experimentati, mai ales daca modificarile apar pe un nev preexistent. Leziunea este plana sau usor palpabila, de obicei cu un diametru cu un diametru mai mare de 5mm, cu margini ne regulate, colorata ne uniform in nuante de brun-negru sau rosietic albastrui. Spre deosebire de melanomul malign in situ, majoritatea nevilor benigni castigati sunt mici, bine circumscrisi, cu margini netede, uniform pigmentati in brun-negru sau albastru.

Microscopic, in stadiul incipient al leziunii plate (2-3mm diametru) exista numai un numar crescut de melanocite unor atipice aranjate sub forma de unitatii solitare la jonctiunea epidermo-dermala si putin deasupra ei. Pe masura ce leziunea progreseaza, apar atipii celulare, iar unele melanocite solitare apar raspandite deasupra jonctiunilor epidermo-dermala. Cu timpul se formeaza cuiburii de melanocite. In stadiul incipient, cand leziunea nu depasesc 3 mm, melanocitele solitare din epiderm si structurile epiteliale ale glandelor anexe predomina fata de cuiburi de melanocite. Aceasta perioada dureaza aproximativ cativa ani de la debutul procesului Ackerman. Ulterior, cuiburile de melanocite de forma neregulatasitate la distante inegale se maresc si tind sa conflueze. In acest stadiu pot fi evidentiate cuiburii de melanocite si celule atipice izolate si in portiunile superioare ale epidermului. Dupa observatiile lui Ackerman, se

pare ca melanocitele atipice din melanomul malign nu descin in derm decat atunci cand in epiderm predomina cuiburile de melanocite fata de melanocitele izolate.

Spre deosebire de melanomul malign in situ, in nevul jonctiunal banal castigat predomina cuiburile de melanocite fata de celulele solitare, chiar si in leziunile nici sub 1mm diametru. Cuiburile celulare din nevul jonctiunal sunt uniforme ca forma si volum , situate de obicei la distante egale unele de altele, la jonctiunea epidermo-dermala de la nivelul crestelor epidermice fara interesarea structurilor epidermale ale anexelor .Atipiile celulare sunt de obicei absente sau discrete. Melanomul in situ poate fi vindecat printr-o excizie chirurgicala limita si are un prognostic excelent.

V.2.3. Clasificarea histogenetica a melanoamelor maligne

In 1967 Clark propune o clasificare histogenetica bazandu-se pe observatiile referitoare la faptul ca melanomele maligne pot prezenta 3 modalitati principale de dezvoltare, indiferent de prezenta sau absenta unui nev preexistent:

Pe fondul petei melanice Hutchinson-Dubreuilh (melanomul de tip lentigo);

Melanomul cu extensie superficiala;

Melanomul ce invadeaza dermul de la inceput, fara existenta anterioara a unei arii pigmentate – melanomul nodular .

Principiul fundamental al clasificarii propuse de Clark este acela ce ca cele 3 tipuri de melanoame reprezinta entitati distincte cu caracteristici biologice si comportamente diferite. Recunoasterea si caracterizarea lor corecta are o deosebita importanta pentru aprecierea prognosticului si stabilirea conduitei terapeutice.

Aproximativ 70% din melanoame (de tip lentigo si cel cu extensie superficeala)prezinta o portiune semnificativa din leziunea primara fie intraepidermal sau imediat sub membrana bazala in tegumentul adiacent zonei invazive a carei prezenta se manifesta clinic printr-o pigmentare anormala. Clasificarea melanomului se bazeaza pe caracteristicile melanocitelor anormale din aceste zone , deoarece in portiunea invaziva a tumorii aspectul histologic este asemanatul indiferent de tipul melanomului.

Clasificarea histogenetica propusa de Clark a fost adoptata la Conferinta Internationala de Cancer de la Sydney (1972) si revizuita in 1982.

Conform acestei ultime clasificari , melanoamele maligne se impart in urmatoarele forme:

- 1) Melanomul malign cu o componenta adiacenta de extensie superficiala;
- 2) Melanomul malign cu o componenta adiacenta de tip lentigo malign;
- 3) Melanomul malign cu o componenta adiacenta de tip lentiginos acral;
- 4) Melanomul malign cu o componenta adiacenta de tip lentiginos mucos;
- 5) Melanomul malign fara nicio componenta adiacenta;
- 6) Melanomul de tip histogenetic neclasificabil.

Oricare din variantele de melanom mentionate mai sus poate fi alcatuita din 3 tipuri celulare diferite: epiteliale, fuziforme si mici . Aceste varietati celulare se recunosc usor cand tumora este in derm, dar celulele epiteloido si fuziforme pot fi identificate si atunci cand sunt situate in intregime in epiderm . Celulele mici de tip nevic sunt mai dificil de recunoscut .

In prezent nu mai este acceptata distinctia facuta de Virchow intre formele de celule epiteloido denumite melanocarcinoame si cele cu celule fuziforme considerate melanosarcome, din urmatoarele considerate:

-Pe aceeasi sectiune se pot observa ambele tipuri de proliferare ca si existenta formelor de trecere intre celulele epiteloido si cele fuziforme;

-Nu exista deosebiri intre cele doua forme in ceea ce privesc malignitatea;

-Electromicroscopic nu s-au putut evidentia deosebiri morfologice intre diferitele tipuri de celule.

Nu sa observat o asociere clara intre tipurile celulare si diferite tipuri de melanom, cu exceptia faptului ca celulele fuziforme sunt mai frecvente in melanoamele de tip lentigo iar cele epiteloido in melanoamele cu extensie superficiala.

V.2.4. Forme particulare de melanom malign

Melanomul cu celule balonizate contine celule mari, cu citoplasma clara, uneori spumoasa, datorita prezentei lipidelor. Concomitent celulele pot contine si granule fine de pigment. Prezenta acestor celule nu influentiaza prognosticul ele putandu-se intalni si in metastaze .

Melanomul demoplasic. Este rara. Se caracterizeaza prin prezenta unei bogate componente fibroblastice intre elementele careia se evidentiaza grupuri de celule melanice . Recunoasterea acestei forme de melanom este importanta deoarece recidiveaza si metastazeaza frecvent .

V.2.5. Metode de apreciere a profunzimii invaziei tumorale si importanta lor

Metoda propusa de Clark apreciaza profunzimea invaziei tumorale in functie de anumite „nivele” microanatomice . Conform acestui sistem adoptat si de Comisia de resort a OMS-ului, melanoamele manigne pot fi impartite in 5 grade:

Gradul 1- toate celulele tumorale sunt situate deasupra membranei bazale, acestea fiind prin definite melanomul in situ;

Gradul 2 - celulele tumorale strapung membrana bazala si infiltreaza dermul papilar;

Gradul 3 - celulele tumorale melanice infiltreaza complet dermul papilar, pana la nivelul zonei de jonctiune dintre dermul papilar di dermul reticular;

Gradul 4 - celulele tumorale patrund printre fasciculele colagene din dermul reticular;

Gradul 5 - invadarea tesutului grasos subcutanat de catre celulele melanice tumorale. Aplicand acest sistem,Clark constata o relatie invers proportionala intre gradul de invazie a tumori di supravietuerea bolnavilor .

V.2.6.Dificultati de diagnostice in melanoamele cutanate

Principalele dificultati in diagnosticul histologic al melanoamelor cutanate se refera in primul rand la diferentierea formelor benigne de cele maligne de alte tumori maligne si benigne. O problema majora o constitutie fara indoiala unui melanom malign primitiv incipient de uni nevi celulari jonctionali sau compusi precum si de unele forme particulare de nevi ca nevil Spitz, nevi albastri, nevil displazi et. In aprecierea caracterului benign sau malign al unei leziuni poliferative melanocitare se va tine cont de o serie de criteri histologice. Fiecare criteriou luat in parte nuare valoare diagnostica absoluta, pentru afirmarea sau excluderea malignitatii, mai importante fiind caracteristicile arhitecturale decat cele citologice . In anumite cazuri dificil, pentru elucidarea diagnosticului este necesara colorarea aspectelor hitopatologice cu datele clinice: varsta bolnavului, localizarea leziunii, evolutia acesteia, existenta unui traumatism in antecedente etc .

Melanoamele maligne invazive se caracterizeaza prin variatii mai citoarhitecturale , realizand aspecte histologice extrem de variate , care pot fi confundate cu alte tumori maligne.

Structura alveolara este cea mai obisnuita, putand constitui aspectul predominant al tumorii. Celulele tumorale pot fi mari, de aspect epiteloid, cu nuclei rotunzi sau ovalri , nucleolatii, de marimi variabile , sau mai mici, cu contururi citoplasmatiche poligonale si nuclei

activi hipercromi. Unele enzinofile din vecinatatea zonei dermo-epidermice pot imbraca un aspect pavimentos care, daca sunt asociate cu modificari pseudoepiteliomatoase ale epidermului pot emita un carcinom pavimentos spinocelular. In aceste celule inca nu sau pus in evidenta niciodata punti intercelulare.

Alteori, alveolele imprecis conturate din celule cu nuclei mari si citoplasma saraca pot imita un limform malign.

Celulele fuziforme sunt in mod caracteristic pleomorfe si slab delimitate . ele pot forma benzi si fascicule imperfecte, ca intr-un fibrosarcom sau pot reproduce aspecte asemanatoare celor din neurofibroamele celulare atunci cand aranjamentul in vartej al celulelor fuziforme sau usor poligonale continand melanina, este asociat unor celule alungite dispuse in palisada. Modificarile secundare pot schimba foarte mult aspectul tumorii, necrozele si hemoragiile intratumorale realizand aspecte pseudoepiteliomatoase care sugereaza o tumora vasculara sau endocrina.

Diagnosticul poate fi extre de dificil in unele cazuri particulare de melano malign. Din aceasta categoria face parte melanomul cu celule balonizate. Tumora primara poate fi interpretata ca si carcicom de glande sebacee cand este situatia in derm , sau ca sarcom cu celule clare cand infiltreaza dermul profund si hipodermul. In cazul metastazelor se impune diagnosticul diferential cu metastaza unui carcinom cu celule clare de origine renala, supararenaliana sau pulmonara.

Melanomul malign desmoplazic descris de Conley poate simula un fibrom, fibrosarcom sau fibroxantom. Coloratiile pt reticula pun in evidenta o structura caracteristica in curand pt un proces epitelial decat mezanchimal. Metastazele maligne glanglionare pot prezenta aspecte ce variaza de la melanomul malign clasic pana la acela unor tumori desmoplazice, ambele forme putanduse intalni in acelasi caz.

Atat in melanomul malign desmoplazic, cat si in melanomul cu celule balonizate , diagnosticul corect este posibil numai prin punerea in evidenta a pigmentului melanic sau cand se poate demonstra continuitatea cu modificarile jonctionale ale unei tumori melanogene. Formele acrone in care relatia cu epidermul nu este evidenta, creaza serioase dificultati de diagnostic.

Ackerman recomanda ca in fata ori carei tumori maligne acrome cu aspect neobisnuit anatomopatologul sa-si puna intrebarea : „nu este posibil oare ca aceasta tumora maligna bizara sa fie un melanom malign?”

CAPITOLUL VI

FORME ANATOMICE-CLINICE

VI.1. Lentigo melanic malign

Elementul caracteristic al leziunii îl constituie prezenta difuza printre celulele normale ale stratului bazal, al melanocitelor maligne pleoforme, iar din punct de vedere clinic, evolutia indelungata de 5-15 ani. Frecventa lui este cuprinsa intre 7-10% din melanoamele maligne primare. Leziunea poate preexista cu multi ani inaintea aparitiei invaziei si este apanajul varstelor mai inalte. Localizarea predilecta o constituie tegumentele frecvent expuse soarelui: fata, gat, maini. Nu are preferinta pentru sex. Macroscopic se prezinta ca o leziune plata, de culoare intre brun inchis si negru, bine delimitata, cu dimensiuni variind intre 1 si 4 cm. Uneori in jurul ei se poate observa o zona de hipopigmentare caracteristica fenomenelor de regresiune spontana.

Are cel mai bun prognostic dintre toate formele de melanom malign cutanat. Faza curabila, care corespunde histogenetic perioadei de evolutie radiala, dureaza in medie 10 ani, dupa care este urmata de evolutia pe verticala, iar clinic se manifesta prin aparitia unor placi sau noduli expansivi care isi dubleaza dimensiunile in intervale scurte de timp (luni), comparativ cu evolutia anterioara. Pacientii remarca schimbarea culorii, unele zone devin palide pe cand altele isi accentueaza culoarea. Maculele pigmentare se transforma in noduli de culoare albastra neagra.

VI.2.Melanomul malign cu diseminare in suprafata

Este forma anatomo-clinica cea mai frecvent intalnita, avand o frecventa de 77% intre melanoamele maligne cutanate. Varful incidentei se afla in al 5-lea deceniu de viata. Distributia pe sexe este aproximativ egala, doar ca se observa o frecenta mai mare pe cap, gat si trunchi la barbati, pe cand la femei predomina localizarea pe membrele inferioare. La ambele sexe cea mai frecventa localizare este pe spate, ea reprezentand 30% din totalitatea aceste forme clinice. Leziunea este intalnita atat pe suprafete expuse la soare, cat si pe cele acoperite, de asemenea pe mucoasele cavitatii orale, baso-faringelui, vulvei, vaginului, penisului si canalului anal.

Macroscopic se prezinta ca o leziune adesea elevata, cu un diametru de 2-3 cm a carei suprafata prezinta o combinatie de culori, de la cafeniu-roscat, maro, pana la negru. La palpare se poate depista o usoara infiltrare a tesuturilor subiacente. Wick considera ca intre dimensiunea leziunii cutanate si nivelul invaziei in profunzime exista un raport direct proportional. Astfel leziunile de pana la 1,5 cm corespund nivelului II de invazie, pe cabd cele de peste 2 cm corespund nivelului V.

Evolutia inainte de aparitia metastazelor poate sa dureze intre 1 si 5 ani, perioada in care recunoasterea si extirparea leziunii duc la vindecari complete.

Aspectele clinice care sugereaza inceperea invaziei melanomului cu diseminare in suprafata pot fi recunoscute inca la leziunile de 5mm. In aceste momente, culoarea maro sau neagra, pana acum dominanta incepe sa „paleasca” iar leziunea din plana devine nodulara, observandu-se o accelerare a cresterii dimensiunilor, care se pot dubla la intervale de saptamani. Suprafata nodului apare catifelata iar culoarea poate avea nunate de albastru negru sau chiar roz. Uneori poate aparea ulcerarea suprafetei sau sangerarea in cantitati mici. Aceasta ultima faza este asociata cu nivelul Clark III, IV, V.

VI.3. Melanomul malign nodular

Reprezinta cca. 10-15% din totalitatea MM, maximul frecventei situandu-se in jurul varstei de 50 de ani. Desi nu reprezinta o adevarata predilictie pentru sex, cel mai adesea il descoperim pe trunchiul barbatilor. Apare atat pe zonele expuse la soare cat si pe cele acoperite, la fel ca si pe mucoase. Macroscopic se prezinta ca o formatiune tumorala nodulara, fara halou pigmebtar. Dupa descrierea facuta de Dimitrescu, leziunea eate : „, variabila ca forma si

dimensiuni, rotunda hemisferica, cu diametrul de 1-2 cm, sau vegetanta, mai mult sau mai putin proeminenta de forma neregulata, polilobata, uneori cu baza de implantare mai ingusta”.

Culoarea tipica este albastru inchis, sau negru, dar poate fi si acromic. Omogenitatea coloratiei variaza, mai alea la cazurile cu evolutie rapida, cand suprafata melanomului devine „tigrata”.

Baza tumorii prezinta o infiltrare moderata care, de regula, se limiteaza la suprafata de implantare. Desi in mod obisnuit nu evolueaza spre ulcerare, dupa traumatisme si aparitia infectiei secundare, suprafata melanomului devine discontinua, apare sangerarea, iar pe pansamentul aplicat se pot vedea pete negre, date de melanocitele detasate din tumora. La aceste cazuri tumora poate fi inconjurata de un halou inflamator de intensitate si dimensiuni variabile.

In jurul tumorii primare pot fi gasite tumori sarelite sau forma de pete pigmentare sau mici noduli, leziuni ce sunt interpretate ca metastaze „in tranzit”.

Evolutia melanomului malign nodular este cea mai scurta dintre toate formele anatomo-clinice de melanom malign. Intre debutul tumorii si aparitia metastazelor cauzatoare de deces trece un interval cuprins intre cateva luni si 2 ani.

VI.4.Lentigo malign acral

Termenul a fost introdus de Reed in 1970 si defineste leziunile lentiginose melanice ce se dezvoltă pe extremitatile corpului neacoperite de par: palma, picătta, perunghial. Uneori denumirea o intalnim si referitor la leziunile melanice situate la jonctiunile mucocutanate.

Este cel mai frecvent tip de melanom descris la rasa neagra.

Evolutia este inceata, de obicei dureaza ani de zile si nu are o legatura etiologica evidenta cu factorii actinici. Leziunile disemineaza predominant, orizontal, putand atinge dimensiuni de peste 10 cm. Dupa Kerl aceasta forma anatomo-clinica reprezinta 7,5% din totalitatea melanoamelor maligne. Se pare ca exista o predilectie pentru sexul feminin.

Incidenta metastazelor ganglionare in momentul diagnosticului este de 30%, iar supravietuirea globala la 5 ani ajunge la 59%. In stadiul II de boala, cei mai multi pacienti decedeaza in primii 2 ani de evolutie, in timp ce bolnavii din stadiul I, ajung la 5 ani in proportie de 90%.

Melanomul malign subunghial, impreuna cu **panaritiul melanicq reprezinta 2-3%** din totalitatea melanoamelor maligne. Repartitia lor este aproape egala intre maini si picioare, avand localizarea cea mai frecventa sub unghia policelui sau a halucelui. Dintre aceste doua forme, melanomul subunghial afecteaza 2/3 din cazuri. La rasa neagra, unde incidenta melanomului este redusa, MM subunghial reprezinta un procent 15-20% din totalitatea melanoamelor, intalnindu-se in deosebi la indivizii varstnici, intre 50-70 ani.

Debutul sau este sub forma unei pete melanice subunghiale care impregneaza matricea omogen sau sub forma de striuri longitudinale. Cel mai frecvent aceasta forma de melanom se confunda cu hematomul subunghial. Diferentierea se face prin modul de migrare al petei colorate; in cazul melanomului pata colorata se extinde progresiv catre extremitatea craniala a falangeu, persistabd pe locul unde a aprut, pe cabd in cazul hematomului pata migreaza spre extremitatea libera a unghiei. Dupa Dimitrescu, melanomul subunghial ar putea fu similar melanomului cu extensie in suprafata. In evolutia acestui MM, malignizarea ramabe mult timp numai histologica, expresia clinica parand mult mai tarziy, obiectivandu-se printr-o tumora burjonanta, situata sub-sau periunghial.

Cei mai multi bolnavi cu melanom subunghial se prezinta la medic datorita aparitiei uniri striuri subunghiale, fara un istoric de leziune pigmentata preexistenta. Pacinetii atrag de obicei atentia ca leziunea a aparut dupa un traumatism. Simptomatologia in aceasta etapa cuprinde: durere, discomfort, deformarea unghiei, scurgere seroasa sau sangeranda din patul unghial sau din tesuturile din jur. Din acest motiv bolnavii se prezinta tarziu la medic, durata medie de intarziere fiind de 2 anu. Mai mult, la majoritatea acestor bolnavi se gasesc in antecedente tratamente adresate traumatismului, motive care duc la prezenta metastazelor ganglionare la aproximativ 1/3 din bolnavii diagnosticati. Datorita prezentei aceatei simptomatologii de granita, Hutchinson recomanda in 1886: „ marginea inflamata a unghiei va fi atebt observata, pentru a depista o linie fina de culoare neagra a carbunelui.”

Dar nu este mai putin adevarat ca aproximativ 1/5 melanoamele subunghiale sunt amelanotice ceea ce ridica mari probleme de diagnostic. Diagnosticul diferential acopera o arie foarte larga de leziuni ale patului unghial, incepand de la hematom, granulomul piogenic, paronichia, pana la nevii benigni. Pentru diferentierea acestora, singura metoda eficienta este

biopsia. Aceasta trebuie sa includa si o zina din portiunea proximala a matricei, intreaga unghie si patul acesteia pana la periost.

In cadrul melanoamelor acrale se constata o diferenta semnificativa a supravietuirii in functie de localizare. Sydney Melanoma Unit raporteaza o supravieturie la 5 ani de 83% pentru melanoamele subunghiale, pe cand pentru cele plantare doar de 42%.

Panaritiul melanic simuleaza cel mai frecvent unghia incarnata. Primul diagnostic este de aceea eronat la peste 70% din cazuri ceea ce duce la instituirea unor tratamente cu totul neadecvate. Apare de obicei ca un melanom malign acromic in pielea sanatoasa. Caracterul inflamator intretinut de traumatisme si infectia secundara ii confera aspectul unui panaritiu sau al unghiei incarnate.

CAPITOLUL VII

DIAGNOSTIC

VII.1.Diagnosticul pozitiv

VII.1.1 Diagnosticul clinic

Este la fel de dificil de efectuat atat pentru melanomele provenite din nervii pigmentari, cat si pentru cele aparute de novo sau cu tumora primara necunoscuta. Cum insa in marea majoritate a cazurilor ne aflam in fata unor bolnavi cu antecedente „nevice”, accentual in stabilirea precoce a malignitatii se pune pe depistarea primelor semne de transformare maligna a acestor leziuni. Pentru melanoamele de novo aspectul clinic este al uneia din formaele anatomo-clinice descrise la capitolul anterior. In cazul debutului prin metastaza, uneori putem depista antecedentele personale, extirpaea unor leziuni mici, de cele mai multe ori pediculate, sau cauterizari de „pete” sau „negi”, in ambele cazuri examenul histopatologic nefiind efectuat.

VII.1.2 Diagnosticul paraclinic

Biopsia. Aprecierea clinica a diagnosticului nu este suficienta datorita marelui indice de eroare pe care il prezinta. Kopf a gasit ca diagnosticul clinic concaorda cu cel histologic la numai 64% din cazuri.Se apreciaza ca 1 din 3 cazuri apreciate histologic sunt gresit apreciate din punct de vedere clinic. Alte procedee termoclinice ca termografia, conductivitatea electrica, capacitatea de retinere a fosforului radioactiv, nu au dat satisfactie in aprecierea, capacitatea de retinere a fosforului radioactiv, nu au dat satisfactie in aprecierea diagnosticului pozitiv. In aceasta situatie, biopsia este cel mai sigur procedeu de diagnostic. Biopsia unu nev care ridica suspiciuni de malignitate, reprezinta, de altfel si primul tratamentul melanomului. Citirea materialului de catre un morfopatolog experimentat esteun element absolut necesar in vederea stabilirii conduitei terapeutice ulterioare.Decizia terapeutica poate fi luata si in urma examenului histopatologic „la gheata” sau extemporneu. Pentru a beneficia de rezultatele unui astfel de examen, piesa prelevata trebuie sa fie de cel putin 0,5cm. diametru pentru a se putea stabili atat diagnosticul formei

anatomo-patologie, cat si stadialitatea microscopica, reprezentata de nivelul de invazie si grosimea tumorii, incepand de la membrana bazala spre profunzime.

In legatura cu modul de prelevare al biopsiei, au aparut o serie de controverse. Dupa unii autori biopsia prelevata prin incizia tumorii ar grabi evolutia negativa a tumorii. De aceea, majoritatea autorilor recomanda prelevarea materialului biopsic prin excizia totala a tumorii, care constituie astfel primul ei tratament, examenul histopatologic al acestui material ramanand sa stabileasca, in functie de microstadialitate, daca interventia chirurgicala trebuie sau nu largita, sau daca sunt necesare tratamente adjuvante. In ceea ce priveste modalitatea abiopsiei excezionale, se considera ca linia de incizie a tegumentului peritumoral trebuie facuta in directia de diseminare a bolii. Daca examenul histopatologic confirma diseminarea, largimea exciziei ulterioare va trebui sa acopere si aceasta zona.

O biopsie excizionala, care in mod obisnuit este fuziforma, trebuie sa aiba o distanta de 3-10mm de la marginile anatomice ale tumorii si o grosime care sa includa si grasimea subtegumentare. Respectand aceste recomandari, anatomopatologul va putea sa ofere chirurgului date suficiente cu privire la nivelul de invazie si grosime a leziunii, elementele care influenteaza extensia actului chirurgical.

Pana in prezent nu exista date obiective care sa ateste ca biopsia incizionala ar a grava prognosticul bolii, de aceea Moseley considera ca aceasta biopsie este indicata in special pentru leziunile mai mari de 2cm sau pentru leziunile fetei. Biopsia prin incizie trebuie efectuata in zona ceam mai neregulata sau mai proeminenta a leziunii. In materialul prelevat trebuie sa se includa si o zona de tesut normal din vecinatatea zonei biopsiate.

Diagnosticul biologic si biochimic. Tehnicile de diagnostic cuprinde sub acest titlu, incerca sa stabileasca prezenta MM pe baza depistarii unor produse biologici si biochimici mai mult sau mai putin specifici bolii respective. In aceasta categorie intra depistarea unor anticorpi antitumorali sau a unor proteine specifice tumorii melanice, precum si a unor substante metabolice, acid sialic, fucoza, carea au o oarecare specificitate tumorala.

In 1979, Copeman si Cooke studiaza semnificatia depistarii pe cale imunologica in celulele melanomului malign, a unei proteine specifice, denumita Melanoma Specific Protein (MSP), care nu a fost gasita in celulele altor tumori maligne. In urma cercetarilor s-a ajuns insa la

concluzia ca MSP apare si in urina bolnavilor cu dermatoze proteinei pentru MM isi pierde suportul obiectiv, depistarea ei avand doar rol orieentativ pentru leziunile pigmentare.

In ultimii ani, prin izolarea anticorpilor monoclonali, depistarea imunologica a MM a caparat o mai mare nota de specificitate. In capitolul "Tratamentul imunologic" acesta problema va fi prezentata pe larg.

Melanuria are valoare diagnostica numai in cazurile avansate, cu metastaze hepatice, deoarece de cele mai multe ori numai acum devine pozitiva. In acest moment pigmentarea urinei poate fi observata chiar cu ochiul liber. Dimitrescu atrage atentia asupra faptului ca uneori melanuria microscopica aputut fi gasita chiar la indivizi clinic sanatosi si la care urmariti in timp nu au dezvoltat boala.

Determinarea fosfatazei alcaline si a transaminazei serice poate de asemenea da relatii asupra functiei ficatului metastazat, nefiind nici ea specifica MM.

Decele experimentale au demonstrat ca glicoproteinele de membrana par sa fie rapunzatoare atat de receptia influentelor din mediu cat si de secretia anumitor substante sau metaboliti, cunoscuti indeobste sub numele de markeri. In ultimii ani s-au semnalat rezultate care sustin ca o parte din glicoproteinele circulante sunt secretate de catre celulele tumorale sau rezulta din tumoverul sau degradate membranei celulare a acestora.

Pronindu-se de la aceste constatari experimentale, cercetari efectuate la I.O.C.-N., au remorcat constant ca nivelul fucozei serice si a a cidului siric determinate dinamic, se coreleaza semnificativ cu evolutia MM si rezultatele terapeutice.

Rezultatele de etapa ale cercetarii confirma importanta asocierii acestor doi markeri biochimici, a caror crestere de nivel seric dupa aplicarea sanctiunii terapeutice, ne permite sa suspectam reluarea evolutiei bolii, in sensul aparitiei recidivei lor si/sau a metastazelor inainte ca aceasta sa se manifeste din punct de vedere clinic.

Metode fizice de diagnostic. Intre aceste metode de diagnostic se citeaza termografia, termoviziunea tumorii, metode care se bazeaza pe faptul ca la nivelul tesuturilor cu grad inalt de miozavalorile termice sunt mai mari decat tesuturile normale si scintigrafia, care poate evidentia aparitia leziunilor metastatice.

VII.2. Diagnosticul diferential

In principal diagnosticul melanoamelor maligne se va face cu:

VII.2.1 Nevul pigmentar benign

Aceasta leziune are o crestere lenta, odata cu inaintarea in varsta a individului, limitele maxime fiind atinse la varsta adulta. Dupa intervale variabile de timp unii dintre acesti nevi isi pot modifica aspectul atat clinic cat si histologic. Urmarirea indelungata, macroscopica, a dovedit ca nevil jonctional nu poate fi considerat activitate jonctionala fara ca evolutia ulterioara sa se faca spre malignitate. Statistic insa, nevil cu activitate jonctionala da cele mai multe melanoame maligne.

Nevii pigmentari se prezinta cu o gama variata clinico-morfologica, care deseori poate duce la confuzii cu aspecte maligne, de aceea este, credem, utila o prezentare completa a caracterelor lor clinice.

Nevi pigmentari macilosi. Aparca niste pete pigmentare, rotunde, ovalare sau cu contur policiclic, de dimensiuni variabile si culoare brun inchisa, cu centrul mai intens colorat decat periferia. Este o leziune plana care respecta santurile normale ale pielii.

Nevii pigmentari proeminenti. In aceasta grupa se gasesc:

Nevii "en dome", usor reliefati de forma rotunda, cu suprafata bombata, neteda sau cu mici neregularitati, avand margini ne delimitate si dimensiuni care nu depasesc 1cm. Debutul lor este plasat in copilarie.

Nevii tuberosi, sunt formati unii in circumstata cu aspect papulos sau tubulos, uneori pediculate, de culoarea pielii sau cu fine teleangiectazii. Practic nu se malignizeaza niciodata.

Nevii papilomatosi, sunt leziuni pigmentare cu suprafata muriforma, de culoare brun. Uneori sunt inconjurati de un halou bine delimitat care se deosebeste de haloul fluu al MM.

Nevul Sutton. Poate fi confundat cu MM deoarece este constituit dintr-un mic nev pigmentar macropapulos cu diametrul de pana la 1 cm inconjurat de un halou perfect rotund, care isi poate modifica culoarea fiind cand alb, cand pigmentat. Histologic prezinta tabloul unui nev mixt-interadermal si jonctional. In evolutia lui se descriu si cazuri de malignizare, de aceea in cazul extinderii lui, se cere ca excizia sa se faca dupa principiile exciziei-biopsie.

VII.2.2. Epiteliomul bazocelular pigmentat

Clinic confuzia cu MM este foarte frecventa. Singurexamenul histopatologic poate face diferentierea. Pentru evitarea unor erori terapeutice, in prezenta unor leziuni suspecte se

recomanda excizia biopsie.

VII.2.3. Veruca sau chetaroza boreica

Este, dupa Dimitrescu leziunea cel mai frecventa confundata cu MM. Diferentierea clinica s-ar putea face prin evidentierea dopurilor pline cu dopuri keratotice. In cazul unor verugi acanotice, ulcerate, orice particularitate distinctiva dispare, iar diagnosticul pozitiv ramane pe seama morfopatologului.

VII.2.4. Granulomul patogensau botriomicomul

Are in antecedente existenta unui traumatism. La examenul clinic se constata strangularea neta la baza tumorii, iar la suprafata ei se observa microabcese.

VII.2.5. Angiosarcimatoza Kaposi

In cazurile in care debuteaza si evolueaza ca o leziune unica, aspectul violaceu, uneori cu halou dat de depozitale de hemosiderina, precum ulcerarea si sangerarea, pot sugera MM. Examenul histopatologic dupa excizia-biopsie clarifica dilema.

VII.2.6. Comedoamele gigante

Cele cu diametrul peste 3-5cm care au polul exterior de culoarea cenusie, pot simula un MM in pielea sanatoasa. Extirparea sau extragerea cu o penseta a dopului comedonica clarifica diagnosticul.

VII.2.7. Dermatofibromul pigmentat sau histocitomul

Spre deosebire de MM care se dezvoltă la suprafata pielii avand tendinta exofitica, fibronului este „ingropat” in piele, tumora este inconjurata de un halou pigmentar ce se termina fie net, in pielea sanatoasa, fie difuz, ceea ce constituie, de cele mai multe ori, motivul de confuzie cu MM.

CAPITOLUL VIII

TRATAMENT

În tratamentul melanomului, ca și în celelalte tumori maligne solide, a fost încercat întreg arsenalul pus la dispoziție de terapie; chirurgia, radio-, chimio-, imuno-, hormono- și mai recent hipertermoterapia au fost pe rând, sau simultan încercate cu scopul, declarat, de a ameliora rata scăzută de supraviețuire a pacienților. Din păcate rezultatele nu sunt încă la nivelul eforturilor care se depun.

Chirurgia rămâne, deocamdată, singurul tratament care oferă rezultate mai bune. Radioterapia ca tratament primar sau adjuvant este foarte controversată. Chimioterapia se adresează încă numai tumorilor diseminare, rezultatele ele fiind doar de paliere. Folosirea agenților citostatici în terapia adjuvantă se pare că ar oferi o ameliorare a prognosticului, dar din păcate rezultatele publicate până la ora actuală sunt contradictorii, iar costul tratamentului este foarte ridicat.

Hormonoterapia și mai ales, imunoterapia au fost introduse în tratamentul MM cu mari speranțe, dar cu toate că au fost comunicate rezultate spectaculare, lipsa lor de generalizare nu a confirmat rapoartele inițiale. În ultimii ani introducerea hipertemiei ca tratament al melanomului, îndeosebi cu localizare pe membre, a dus la obținerea unor rezultate foarte bune, mai ales în stadiul I de boală și în asocieră cu tratamentul chirurgical. Rămâne ca experiența ulterioară să confirme aceste rezultate bune.

PARTEA a II-a. CONTRIBUȚIE PERSONALĂ

CAZURI CLINICE

CAZUL I

Nume: T.M

Vârsta: 40 ani

Sex: F

Mediul de proveniență : rural

Istoricul bolii: Boala a debutat în anul 2001 la nivelul palmei drepte. Nu a existat o leziune pigmentată preexistentă. Leziunea a apărut după un traumatism.

Examen clinic: Boala a apărut sub forma unei pete melanice care impregnează matricea omogen sau sub formă de striuri longitudinale.

Simptome: durere, disconfort, scurgere seroasă sau sângerândă.

Investigații de laborator: biopsie

S-au prelevat 0,5 cm diametru prin excizia totală a tumorii.

Macroscopic se prezintă sub forma unei leziuni pigmentate, plate, de culoare brună sau neagră care era asociată cu un nodul ulcerat.

Microscopic MM acral se caracterizează printr-o proliferare de melanocite atipice cu prelungiri dendritice evidente. Acestea sunt prezente în număr crescut în epidermul bazal sau imediat suprabazal adiacent tumorii invazive.

Tratament:

Imunoterapie cu IFN 3MUI s.c. de 3 ori pe săptămână timp de 2 ani;

Chimioterapie cu BNCU (Carmustina) în doze de 150 mg/m² i. v. Ziua 1 la fiecare 6 săptămâni.

Evoluție: favorabilă.

CAZUL II

Nume: V.A.

Sex: M

Vârsta: 60 ani

Mediu de proveniență: urban

Istoricul bolii: A debutat în anul 1999. A existat o leziune pigmentată anterioară apărută cu câțiva ani în urmă. Pacientul a fost diagnosticat la București cu MM cu dispersie în suprafață.

Examen clinic: A debutat sub forma unei alunițe ulceroase maro care a devenit neagră, a crescut, sângera și avea diametrul de 1-2 cm.

Investigații de laborator:

Biochimice : – fosfataza alcalină mărită;

LDH mărit;

Proteina S 100 prezentă

Biopsie.

Macroscopic se prezintă ca o leziune cu diametrul de 2-3 cm sau a cărei suprafață prezintă o combinație de culori, de la roz cafeniu-roșcat, maro, până la negru.

Aceste caracteristici macroscopice sunt foarte bine evidente și în fotografia următoare care i s-a făcut pacientului din cazul prezentat.

Tratament:

Chimioterapie cu Lomustina (CCNU) în doze de 100-300 mg/m² p. o. o dată la 3-6 săptămâni;

Imunoterapie cu IFN 3MUI s. c. 7 zile pe săptămână urmat de 9MUI IL-2, timp de 6 săptămâni după care se continuă cu IFN 3MUI de 3 ori pe săptămână, timp de încă 4 săptămâni.

Evoluție: defavorabilă pentru că a metastazat în ganglionii din piele.

CAZUL III

Nume: M.M

Sex: M

Vârsta: 54 ani

Mediu de proveniență: rural

Istoricul bolii: A debutat în anul 2002. Nu au existat antecedente în familie.

Examen clinic: Apare ca o formațiune tumorală nodulară, fără halou pigmentar, cu diametrul de 1-2 cm, formă neregulată, polilobată, de culoare albastru închis spre negru.

Investigații de laborator:

S-a făcut excizie cu limită de siguranță în anestezie generală.

S-au făcut tomografii în care s-au observat prezența metastazelor cerebrale manifestate prin vărsături, dureri de cap, tulburări de vedere, de echilibru, de vorbire, hemiplegie, afazie.

Tratament:

Imunoterapie cu IFN;

Citostatice: DTIC (dacarbazină) 200 mg/m² i. v. timp de 5 zile, la fiecare 3 săptămâni.

Evoluție: defavorabilă.

CAZUL IV

Nume: L.C.

Sex: M

Vârsta: 67 ani

Mediu de proveniență: rural

Istoricul bolii: Boala a apărut în anul 2000. Până în momentul prezentării la medic nu a făcut niciun tratament.

Examen clinic: Apare sub forma unor fisuri și ulcerații prin care se exteriorizează muguri cărnosi, roșii, umezi, umezeală datorată unei secreții seroase sau sângerânde.

Investigații de laborator:

Investigații radiologice;

Tomografie;

Biopsie.

Tratament:

Imunostimulatoare;

Citostatice: CBDCA (Carboplatin) în doze de 400 mg/m^2 i. v. la fiecare 3 săptămâni.

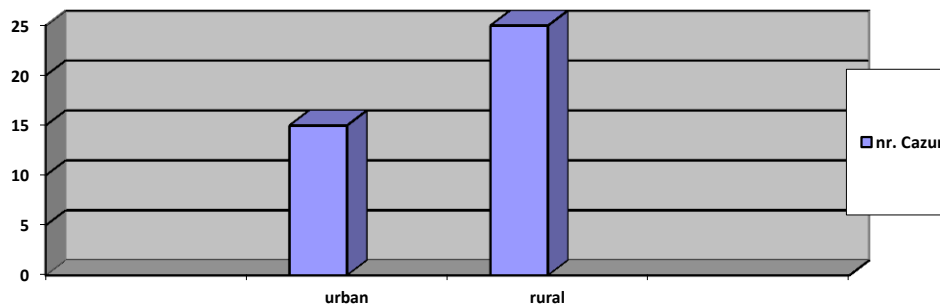
Evoluție: favorabilă.

STATISTICĂ ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Repartiția pe medii de proveniență a numărului total de cazuri de melanom malign în anul 2000

Anul	Număr total de cazuri	Număr cazuri în mediul urban	Număr cazuri în mediul rural
2000	40	15	25

Repartiția pe medii de proveniență a cazurilor de melanom malign în anul 2000 -mediul urban și mediul rural

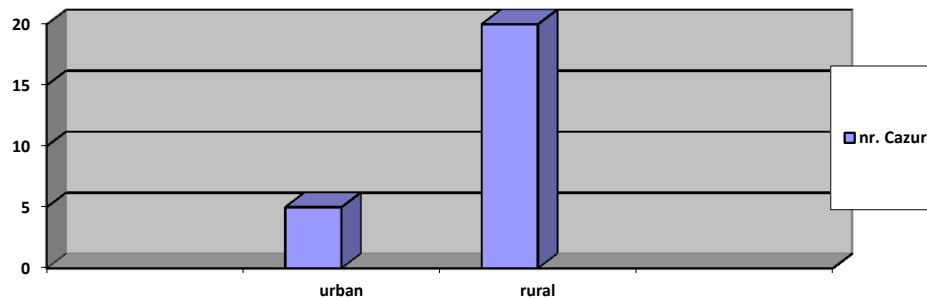


După cum se poate observa incidența este comparabilă cu media statistică multianuală la nivel național și cu datele din literatură, egală între cele 2 medii (rural/urban), frecvența cazurilor fiind legată de condițiile de mediu, ca stări favorizante ale apariției melanomului malign, dar și un grad mai mare de prezentare la medic a acestor bolnavi. Ca distribuție se constată o mare variabilitate, ceea ce înseamnă o lipsă de omogenitate a bolnavilor luați în studiu, datorită faptului că s-au luat în discuție bolnavi prezentați în mod aleator la medic.

**Repartiția pe medii de proveniență a numărului total de cazuri de melanom malign
la grupa de vârstă Peste 65 de ani în anul 2000**

Anul	Peste 65 de ani		
	Nr. total de cazuri	Nr. de cazuri în mediul urban	Nr. de cazuri în mediul rural
2000	25	5	20

**Repartiția pe medii de proveniență a cazurilor de melanom malign
la grupa de vârstă Peste 65 de ani în anul 2000**

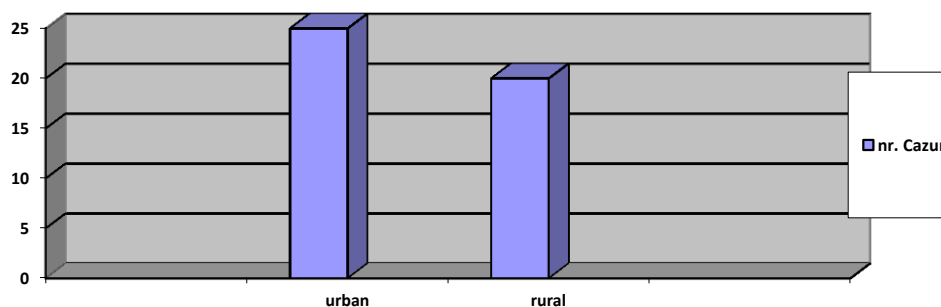


La lotul de bolnavi din categoria de vârstă > 65 ani se înregistrează valori mai mari decât cele înregistrate la nivel național, datorită unor fenomene nesemnificative statistice (pragul de sensibilitate al parametrilor testului este sub valoarea 0,01). Se detașează grupul provenind din mediul rural, unde expunerea la radiații prin muncile agricole, ca și gradul mai scăzut de educație sanitară și igienă reprezintă factori favorizanți care explică această distribuție.

Repartiția pe medii de proveniență a cazurilor de melanom malign în anul 2001

Anul	Nr total de cazuri	Nr cazuri in mediul urban	Nr cazuri in mediul rural
2001	45	25	20

Repartiția pe medii de proveniență a cazurilor de melanom malign în anul 2001



Se observă aceeași incidență, comparabilă cu media statistică multianuală la nivel național și cu datele din literatură, distribuția fiind egală între cele 2 medii (rural/urban). Tendința se păstrează comparabilă cu anul precedent. Ca distribuție se constată aceeași mare variabilitate, datorită lipsei de omogenitate a bolnavilor luați în studiu și faptului că s-au luat în discuție bolnavi prezentați în mod aleator la medic.

Repartiția pe grupe de vârstă și medii de proveniență a cazurilor de melanom malign în anul 2001

Anul	Sub 1 an		
	Total cazuri	Nr cazuri in mediul urban	Nr cazuri in mediul rural
2001	-	-	-

Anul	1-14 ani		
	Total cazuri	Ne cazuri in mediul urban	Nr cazuri in mediul rural
2001	-	-	-

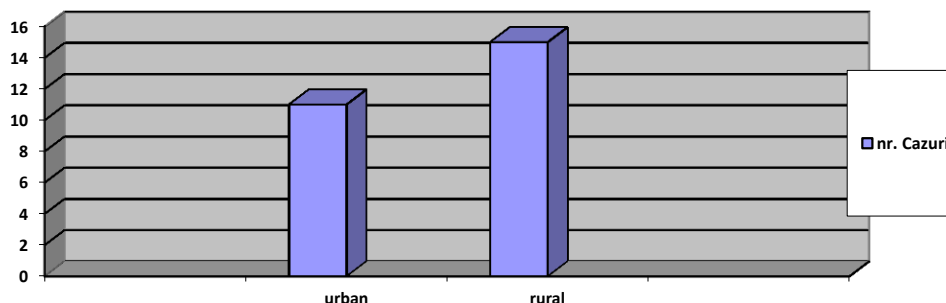
Același aspect și pentru populațiile aparținând de vârstă menționate, ceea ce denotă păstrarea trebdului distribuției statistice. Este cazul să ne bucurăm că aceste categorii de vârste nu sunt afectate.

Anul	15-64		
	Total cazuri	Ne cazuri in mediul urban	Nr cazuri in mediul rural
2001	19	14	5

Această distribuție semnifică situarea în parametri înregistrați ca medie specifică națională multianuală pentru categoria de vârstă 15-64 ani, ca și păstrarea tendinței înregistrate în anul precedent. Adresabilitatea bolnavilor se păstrează în continuare mai bună decât în cazul altor tumori maligne, melanomul având avantajul că este situat la vedere, pe tegument. Distribuția omogenității arată aceeași dispersie ridicată, parametrii fiind bruți, ca și pentru anul precedent, iar valorile lor neajustate, datorită modului aleator de selectare a lotului luat în studiu.

Anul	Peste 65 ani		
	Total cazuri	Ne cazuri in mediul urban	Nr cazuri in mediul rural
2001	26	11	15

Repartiția pe medii ca proveniență a cazurilor de melanom malign la grupa de varsta peste 65 ani în anul 2001

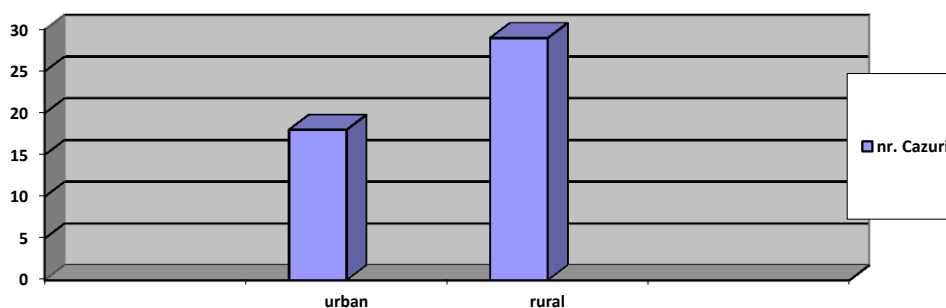


La lotul de bolnavi din categoria de vârstă > 65 ani se înregistrează valori compatibile cu cel înregistrate la nivel național, datorită unor fenomene ne semnificative statistic. Se egalează distribuția grupurilor provenind din mediul rural cu cel din urban, ceea ce denotă o mai bună depistare din partea medicilor de familie din urban.

Repartiția pe medii de proveniență a numărului total de cazuri de melanom malign în anul 2002

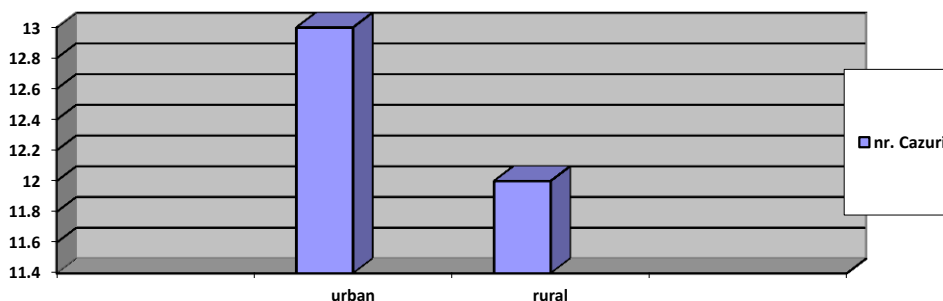
Anul	Nr total de cazuri	Nr cazuri in mediul urban	Nr cazuri in mediul rural
2002	47	18	28

Repartiția pe medii de proveniență a cazurilor de melanom malign în anul 2002



Per total se constată o notă preponderată a cazurilor provenite din rural, cu o diferență statistică globală semnificativă (pragul de semnificație al testului) ceea ce mă determină să consider ca factorii favorizanți agreeți în mediul rural și-au spus cuvântul.

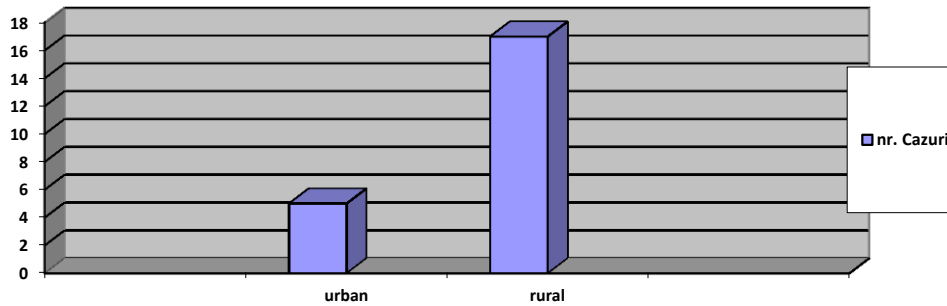
**Repartiția pe medii de proveniență a cazurilor de melanom malign
la grupa de vârstă 15 - 64 ani în anul 2002**



O echilibrare a valorilor pentru această categorie de vârstă pe cele 2 medii de proveniență semnifică faptul că nu au apărut factori de eroare care să distorsioneze rezultatele înregistrate.

Anul	Peste 65 ani		
	Total cazuri	Ne cazuri in mediul urban	Nr cazuri in mediul rural
2002	22	5	17

**Repartiția pe medii de proveniență a cazurilor de melanom malign la grupe de varsta peste
65 ani in anul 2002**

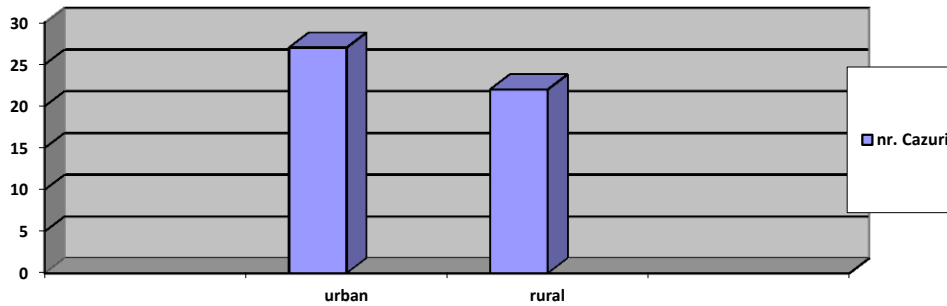


La această categorie de vârstă se întegistreză clar valori mai mari decât media națională multianuală, ceea ce dovedește un profil caracteristic mai special al bolnavilor din județul Argeș pentru anul luat în studiu. În plus, se observă o notă predominantă a bolnavilor provenind din mediul rural, unde factorii favorizanți (radiațiile luminoase, traumatismele, igiena deficitară) își spun din nou cuvântul.

Repartiția pe medii de proveniență a numărului total de cazur de melanom malign în anul 2003

Anul	Nr total de cazuri	Nr cazuri in mediul urban	Nr cazuri in mediul rural
2003	49	27	22

Repartitia pe medii de provenienta a cazurilor de melanom malign in anul 2003



Per total se constată din nou o ușoară preponderență a cazurilor provenite din mediul rural, cu o diferență statistică globală nesemnificativă (pragul de semnificație al testului). În dinamică față de anii anteriori se poate constata aceeași tendință, atât în valori absolute, cât mai ales în valori procentuale. Distribuția din punctul de vedere al omogenității este caracterizată printr-o mare dispersie, datorită diferențelor semnificative între parametrii luați în studiu în formarea loturilor (medii de proveniență și de lucru, vârsta, sexul, modul de viață etc.).

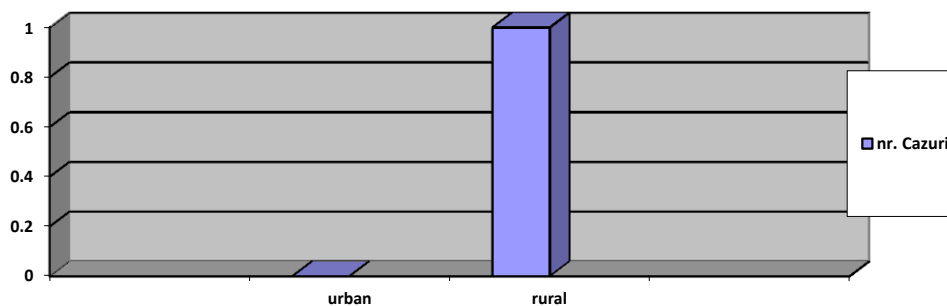
Repartitia pe grupe de varsta si medii de provenienta a cazurilor de melanom malign in anul 2003

Anul	Sub 1 an		
	Total cazuri	Nr cazuri in mediul urban	Nr cazuri in mediul rural
2003	-	-	-

Anul	1-14 ani		
	Total cazuri	Ne cazuri in mediul urban	Nr cazuri in mediul rural
2003	-	-	-

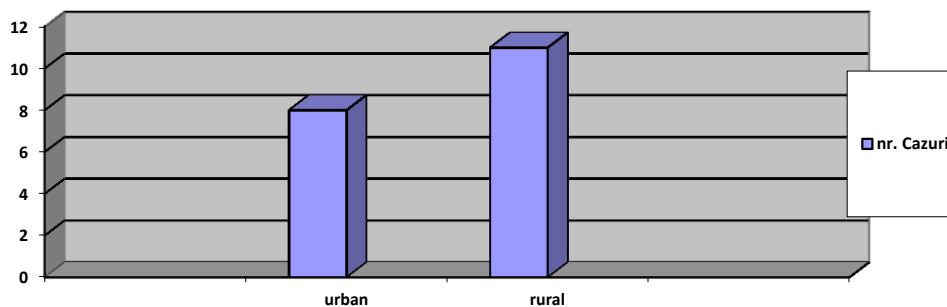
Cazul singular întâlnit la categoria de vârstă 1-14 ani nu modifică practic cu nimic profilul înregistrat în anii precedenți, atât ca distribuție cât și ca dinamică. Cazul provine din nou din mediul rural unde factorii favorizanți menționați acționează preponderent.

Repartitia pe medii de provenienta a cazurilor de melanom malign la grupa de varsta 1-14 ani in anul 2003



Anul	15-64		
	Total cazuri	Ne cazuri in mediul urban	Nr cazuri in mediul rural
2003	19	8	11

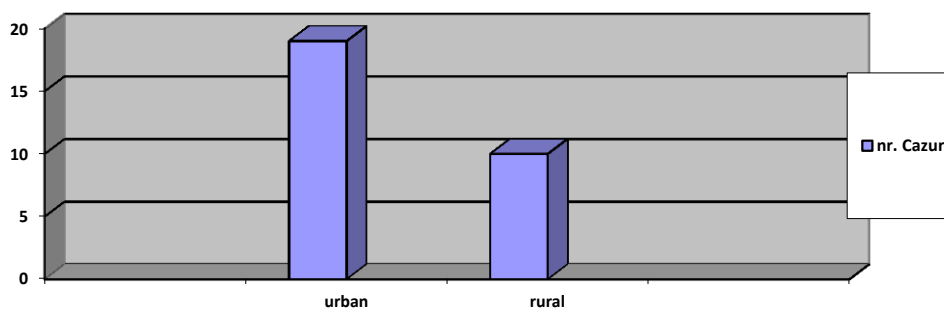
Repartitia pe medii de provenienta a cazurilor de melanom malign la grupa de varsta 15-64 ani in anul 2003



Repartiția pe medii de proveniență a numărului total de cazuri de melanom malign la grupa de vârstă Peste 65 de ani în anul 2003

Anul	Peste 65 de ani		
	Nr. total de cazuri	Nr. de cazuri în mediul urban	Nr. de cazuri în mediul rural
2003	29	19	10

**Repartiția pe medii de proveniență a cazurilor de melanom malign
la grupa de vârstă Peste 65 de ani în anul 2003**



Numărul de cazuri nou-înregistrate pentru anul 2003 în această imagine rezultată prin coroborarea a 2 parametri (grupe de vârstă cu mediul de proveniență) ne arată o situație mai bună, deși asemănarea procentuală cu anii precedenți cu mențiunea că semnificația statistică este neelecventă (pragul indicelui 1 nu depășește valoarea 0,001).

CONCLUZII

1. În ultimele două decenii s-a observat o creștere foarte accentuată a incidenței MM. Din fericire această creștere a incidenței nu a fost însoțită de o creștere corespunzătoare a ratei de mortalitate. Cu toate că rata de mortalitate este într-o ascendență mult mai „lină” decât incidența, prognosticul bolii rămâne rezervat. Cauza ratei crescute de mortalitate o constituie întârzierea diagnosticului.

2. Incidența MM în județul Argeș este comparabilă cu media statistică multianuală la nivel național și cu datele din literatura de specialitate.

3. Un rol hotărâtor în prevenirea apariției MM îl are educația sanitară a populației care trebuie să cunoască atât factorii de risc, cât și toate semnele care ar putea anunța apariția bolii . Dacă boala s-a instalat deja este importantă diagnosticarea corectă a ei și aplicarea unui tratament corespunzător.

4. MM rămâne o neoplazie cu nivele crescute de mortalitate, cu rezultate nesatisfăcătoare în stadiile avansate, motiv pentru care continuă să reprezinte o preocupare permanentă de cercetare biologică pentru că numai prin integrarea cu clinica se va realiza scopul ameliorării rezultatelor terapeutice actuale.

BIBLIOGRAFIE

1. Schwarz M.I., Epstein P.E.: Pulmonary Medicine and Critical care Knowledge self – assessment Programe, Atlanta 1999.
2. Târlea A: Epidemiologia si factorii de risc în cancerul bronhopulmonar, ed. Horvat T, Dediu M, Târlea A, Ed Universul, Bucuresti 2000: 15-22.
3. Ghilezan N: Oncologia generală, Ed. Medicala, Bucuresti, 1992: 15-31.
4. Gherasim L (sub redacÑie): MedicinăInternă, volumul I, ediÑia a II-a – Bolile aparatului respirator. Editura Medicală,Bucuresti, 2002, pag. 433-479.
5. Hert F.: Detection of very early lesions in lung Cancer: It this important and should they be treated? ERSSchool
Postgraduate Course, ERS Annual Congress 2005, september 17-21, Copenhagen, 29-51.
6. Parkin OM, Pasani P, Ferlay J: Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 1999; 49: 33-64
7. Greenlee RT, Murray T, Bolden S et al: Cancer statistics, 2000. Can Cancer J Clin 2000; 50: 7-33
8. Schottenfeld O: Etiology and epidemiology of lung cancer in Lung Cancer. Principles and practice, 2nd edition; eds. Pass HT, Mitchell IB, Johnson OH, Turrisi AT, Minna IO, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2000
9. Tweedie R, Mengersen K: Lung Cancer and Passive Smoking: Reconciling the Biochemical and Epidemiological Approaches. Br J Cancer 1992, 66: 700-705.
10. Hammond EC: Smoking in relation to the death rates of one million men and women. Natl. Canc. Inst.Monogr 1966; 19:
11. Doll R, Peto R.: Mortality in relation to smoking: 20 years' observations on male British doctors, Br Med J 1976, 2: 1525.
12. Rogot E, Murray JL: Smoking and causes of death among US veterans: 16 years of observation. Public Health Rep 1980; 15:213.
13. Ciuleanu T.E.: Carcinoamele bronhopulmonare: principii si practică. Editura MedicalăUniversitară“Iuliu HaÑeganu.Cluj-Napoca, 2003; 2-74.

14. National Institutes of Health. Respiratory Health Effects of Passive Smoking: Lung Cancer and Other Disorders. Monograph, 1993.
15. Stockwell H, Goldman A, Lyman Noss C, Armstrong E: Environmental Tobacco Smoke and Lung Cancer Risk in NonSmoking Women. *J. Nat Cancer Inst* 1992, 84:1417-1422.
16. Cancer Facts & Figures – 1995. WashingtonDC: American Cancer Society, 1995.
17. Edelman MJ, Gandara DR: Lung Cancer, in *Manual of Clinical Oncology*, 4th edition, eds. Casciato DA, Lowitz BB -Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia 2000: 157- 171.
18. Williams S, Goulet R, Thomas G: Newer aspects in the diagnosis, treatment and prevention of lung cancer. *Current Problems in Cancer*, 1996, XX; 3.
19. Tirmarche M, Raphalen A, Allin F, Chameaud J: Mortality of a cohort of French uranium miners exposed to relatively low radon concentrations. *Br. J. Cancer* 1993, 67: 1090-97.
20. Moolgavkar SH, Luebeck EH, Krewski D, Zielinski J: Radon, Cigarette Smoke and Lung Cancer: A Re-analysis of the Colorado Plateau Uranium Miners Data. *Epidemiology* 1993,4: 204-217.
21. Ward E, Okun N, Ruder A, Fingerhut M, Steenland K: A Mortality Study of Workers at Seven Beryllium Processing Plants. *Am J Int Med* 1992, 22: 885-904.
22. Moulin JJ, Wild P, Mantout B, Fournier N, Mur J: Mortality from Lung Cancer and Cardiovascular Diseases Among Stainless Steel Producers. *Cancer Causes Control* 1993, 4:75-81.
23. Franklin W.A.: Diagnosis of lung cancer. Pathology of invasive and preinvasive neoplasia *Chest* 2000, 117:72S-79S
24. Holland J.F. et col: *Cancer Medicine*, 4th edition, Editura Williams & Wilkins, Baltimore, vol. II, 1999, 1723-1756.
25. Van Zandwijk M: Chemoprevention of lung cancer: from concept to reality, *Annales Academiae Medicae Bialostocensis* 2003, 48: 5-10.
26. Sperber M.: *Radiologic Diagnosis of chest Disease*, Ed. Spinger- Verlag, 1990, 422 – 439.
27. Grancea V.: *Bazele radiologiei si imagisticii medicale*, Ed Med Amaltea, 1996, pag. 105-109.

28. Heywang-Koebrunner SH., Lommatzch B., Fink V., et al: Comparison of spiral and conventional CT in the detection of pulmonary nodules. *Radiology* 189:263-266,1993.
29. Costello P., Anderson W., Blume D.: Pulmonary nodule: Evaluation with spiral volumetric CT, *radiology* 179:875- 876,1991.
30. Stradling P.: *Diagnostic Bronchoscopy*, sixth edition, Ed. Churchill Livingstone, 1991, pag. 114-142.
31. MacDougall B; Wenerman B. the value of sputum cytology. *J Gen Intern Med* 1992; 7:11-13
32. Egri G, Takats A. Related Articles, Links The immunodiagnosis of lung cancer with monoclonal antibodies. *Med Sci Monit.* 2005 Sep;11(9):RA296-300. Epub 2005 Aug 26.
33. Mulshine JL, Treston AM, Scott FM, Avis T, Cynthia B, Kasprzyk PG, Nakanishi Y, Cuttitta F. Lung cancer: rational strategies for early detection and intervention. *Oncology* 1991;5:25-32.34. Tockman MS, Gupta PK, Myers JD, et al. Sensitive and specific monoclonal antibody recognition of human lung cancer antigen on preserved sputum cells: a new approach to early lung cancer detection. *J Clin Oncol* 1988; 6:1685-1693.
35. Mulshine JL, Henschke CI. Prospects for lung cancer screening. *Lancet* 2000; 355: 592-593.
36. Jett JR. Screening for Lung Cancer in High-Risk Groups: Current Status of Low-Dose Spiral CT Scanning and Sputum Markers. *Semin Respir Crit Care Med.* 2000;21(5):385-92.
37. Lam S, Palcic B, Gamer D, et al. Lung cancer control strategy in the new millennium. *Lung Cancer* 2000; 29: Suppl. 2,145.
38. Cooper EH, Splinter TAW, Brow DA. Evolution of a radioimmunoassay for neuron specific enolase in small cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, 1985, 52:333-8.
39. Pujol JL, Greiner J, Ray P., et al. Le Cyphra, 21, un nouveau marqueur du cancer epidermoide des bronches: uncomparaison avec trois autres marqueurs. *Presse Med.* 1993; 22: 039-42.
40. Liu NS, Spitz MR, Kemp BL et al.: Adenocarcinoma of the lung in young patients. *Cancer* 2000; 88: 1837-41.
41. Lienert T, Serke M, Schonfeld N et al.: Lung cancer in young females. *Eur Respir*, 2000, 16: 986-90.

42. Venmans B.J., van der Linden H., van Boxem T.J., et al. Early detection of preinvasive lesions in high-risk patients. A comparison of conventional flexible and fluorescence bronchoscopy. *J Bronchol* 1998; 5:280-3.

43. Khanavkar B.: Auto-Fluorescence (LIFE) Bronchoscopy in the diagnosis of Early Lung Cancer. Results of 400 Examinations and European Early Lung Cancer Study, Abstracts from symposium. Diagnosis and endobronchial management of early lung cancer, 1998, 12-14.

44. Miyazu Y., Miyazawa T., Iwamoto Y., Kano K., Kurimoto N. The Role of Endoscopic Techniques, Laser-Induced Fluorescence Endoscopy and Endobronchial Ultrasonography in Choice of Appropriate Therapy for bronchial Cancer. *J Bronchol* 2001; 8:10-16.

45. Herth F., Becker H.D. EBUS for early cancer detection. *J. Bronchol* 2003; 10:249-253.