

VARIAȚIA DE EXPRESIE A METALOPROTEINAZELOR ÎN MELANOMUL CUTANAT CU REGRESIE, UN POSIBIL INDICATOR DE HETEROGENITATE TUMORALĂ

VARIATION IN EXPRESSION OF METALLOPROTEINASES IN CUTANEOUS MELANOMA WITH REGRESSION, POSSIBLE INDICATOR OF TUMOR HETEROGENEITY

RĂZVAN ANDREI*, SABINA ZURAC*,**, CLAUDIU SOCOLIUC*,**, FLORICA STĂNICEANU*,**

Rezumat

Regresia spontană în melanom este un fenomen relativ frecvent cu semnificație biologică și prognostică neclară. Având în vedere importanța tranziției epitelial-mezenchimală (TEM) în progresia tumorală am analizat expresia imunohistochimică în melanom a unor markeri implicați în TEM: metaloproteinazele (MMP).

Am analizat 93 melanoame (62 melanoame extensive în suprafață; 31 melanoame nodulare), dintre care 39 au prezentat regresie; am analizat componenta regresivă (CR) și componenta non-regresivă (CNR) în melanoamele cu regresie și masa tumorală principală în melanoamele fără regresie (AR). Am comparat expresia fiecărui marker în CNR versus CR în aceeași tumoră și CNR versus AR.

MMP1 și MMP11 și-au diminuat expresia în CNR versus AR ($P=0.047$, $P=0.029$); a fost o tendință spre reducerea expresiei MMP2, MMP3 și MMP13 în CNR versus AR ($P=0.047$, $P=0.029$); s-a remarcat o tendință spre reducerea expresiei MMP2, MMP3 și MMP11 în CR versus CNR. Anumite tipuri de regresie au asociat alterări specifice în expresia MMP. Melanomul cu regresie segmentară (RS) a prezentat o expresie semnificativ mai scăzută a MMP1 comparativ cu AR. Am demonstrat diferențe imunofenotipice în CR și zonele de CNR, CNR fiind similar cu AR; cel mai probabil regresia în melanom este o expresie fenotipică a heterogenității intratumorale,

Summary

Spontaneous regression in melanoma is a relatively frequent phenomenon with unclear biologic and prognostic significance. Considering the importance of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor progression we analyzed immunohistochemical expression in melanoma of several EMT-involved: metalloproteinases (MMP).

We analyzed 93 melanomas (62 superficial spreading melanomas; 31 nodular melanoma), 39 of them presenting regression; we analyzed regressed component (RC) and non-regressed component (NRC) in melanoma with regression and the main tumor mass in melanoma without regression (AR). We compared the expression of each marker in NRC versus RC in the same tumor and in NRC versus AR.

MMP1 and MMP11 had diminished expression in NRC versus AR ($P=0.047$, $P=0.029$); there was a tendency towards reduced expression of MMP2, MMP3 and MMP13 in NRC versus AR; tendency towards diminished expression of MMP2, MMP3 and MMP11 in RC versus NRC was noted. Certain type of regression associated specific alterations in MMPs expression. Melanoma with segmental regression presented significant less expression of MMP1 than AR. We demonstrated different immunophenotype in RC and NRC areas, NRC being more similar to AR; more likely regression in melanoma is one phenotypical expression of intratumor heterogeneity, some

* Departamentul de Anatomie Patologică, Spitalul Clinic Colentina, București.

Department of Histopathology, Colentina Clinical Hospital, Bucharest.

** Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila, București.

Carol Davila University of Medicine and Pharmacy, Bucharest.

unele forme de regresie asociind factori de prognostic favorabili.

Cuvinte cheie: melanom cu regresie; metallo-proteinaze; heterogenitate tumorală

Intrat în redacție: 4.08.2015

Acceptat: 7.09.2015

forms of regression associating more favorable prognostic factors.

Keywords: melanoma with regression; metallo-proteinase; tumor heterogeneity

Received: 4.08.2015

Accepted: 7.09.2015

Introducere

Melanomul este unul dintre cele mai agresive cancere ale omului, cu un prognostic infaust într-o proporție mare de cazuri reprezentând astfel una din cele mai mari provocări în practica actuală dermatologică, patologică și oncologică. Tratatamentul melanomului este bazat actualmente pe stadiul tumoral cum este recomandat de AJCC (American Joint Committee for Cancer – versiunea 7 din 2010); principalii parametri sunt morfologici (grosimea tumorală, ulcerarea, metastazele limfoganglionare sau în alte organe) și serice (lactat dehidrogenaza serică) [1]. Prognosticul este foarte variabil, de exemplu în cazul melanomului localizat mai gros de 1 mm rata de supraviețuire la 5 ani variază între 50 % și 90 % [2]. De asemenea, în cazurile avansate de boală, tratamentul este foarte variat, folosindu-se diferite clase de medicamente cu efect chimioterapeutic clasic precum dacarbazina, care intervin în diferite căi moleculare precum vemurafenib sau imatinib și medicamente care influențează răspunsul imun precum ipilimumab. Caracteristicile imunogenice ale melanomului sunt atât de importante încât multe terapii terapeutice folosesc vaccinuri împotriva unor diferiți epitopi, unele dintre ele cu rezultate promițătoare.

A pătrunde în mecanismele intime folosite de organism împotriva celulelor tumorale, reprezintă o problemă de primă importanță în a proiecta noi regimuri terapeutice. O astfel de abordare este reprezentată de studii privind distrucția celulelor tumorale din melanom de către infiltratul inflamator local – regresia spontană. Regresia este reprezentată de către dispariția completă sau parțială a tumorii dincolo de limitele în care celulele tumorale pot fi identificate fie morfologic fie imunohistochimic; în zonele de regresie celulele tumorale sunt înlocuite de un infiltrat inflamator limfocitar cu

Introduction

Melanoma is one of the most aggressive cancers in humans with infaust prognosis in a significant proportion of cases, thus representing one of the most important challenges in current dermatologic, pathologic and oncologic practice. Treatment in melanoma is currently based on stage of the tumor as it recommended by American Joint Committee for Cancer (7th version 2010); the main parameters are morphologic (tumor thickness and/or ulceration, metastases in lymph nodes or other organs) and seric (serum lactate dehydrogenase) [1]). Prognosis is highly variable, for instance in case of localized melanoma thicker than 1 mm the 5 years survival rate varies from 50% to 90% [2]. Also, in advanced cases, treatment is highly variable using several types of drugs with classic chemotherapeutic effect as dacarbazine, intervening in various pathways such as vemurafenib or imatinib and influencing host immune response as ipilimumab. The immunogenic characteristics of melanoma are so important so many therapeutic trials use vaccines against different epitopes, some of them with promising results.

Getting insights within mechanisms used by the host against melanoma cells is a matter of prime importance in designing new therapeutic regimens. One such approach may be represented by studying the natural destruction of the melanoma cells by local inflammatory infiltrate - spontaneous regression. Regression is represented by complete / partial disappearance of tumor beyond the limit at which tumor cells can be identified either morphologic or by immunohistochemistry; in the regressed area the tumor cells are replaced by lymphocytic inflammatory infiltrate with variable number of melanophages in fibrotic background with prominent hyperplastic vessels; extreme cases present complete disappearance of tumor cells - tumor melanosis.

un număr variabil de melanofage pe un fond fibrotic cu hiperplazie vasculară; cazuri extreme prezintă dispariția completă a celulelor tumorale – melanoză tumorală. Regresia apare cu o frecvență variabilă, în funcție de stadiul și tipul de regresie: regresia parțială este relativ comună, găsindu-se în 10-35% din toate cazurile indiferent de stadiul tumoral și în peste 60% din melanomul mai subțire de 0.75 mm, în timp ce regresia completă este extrem de rară (aproximativ 0.25% în studii mari) [3-7].

În ciuda frecvenței mari, nu există un consens de opinie privind atât semnificația biologică cât și prognostică a regresiei din melanom. Actualmente, sunt exprimate câteva opinii divergente, de către diferiți autori, privind prognosticul și evoluția melanomului cu regresie: există studii care leagă regresia de un prognostic favorabil [8,9], alte studii observă asocierea cu un prognostic prost [10-14] în timp ce alte studii nu au putut asocia nici un fel de prognostic favorabil sau nefavorabil [3,15-17]. Nici unul dintre aceste studii nu au descifrat mecanismele biologice implicate în regresie și de asemenea sunt date puține despre mecanismele folosite de unele celule tumorale de a scăpa de acest răspuns imun, de altfel specific; în ciuda acestor incertitudini, diferite linii de imunoterapie și-au dovedit eficacitatea în tratamentul oncologic: ipilimumab în diferite cancere (melanomul metastatic [18], cancerul renal metastatic [19] sau adenocarcinomul pancreatic metastatic [20]), imunizarea activă (vaccinuri) [21,22] sau transferul imun celular adoptiv sau activarea celulelor implicate în imunitate [23,24]. Coexistența regresiei și a progresiei în aceeași tumoră, indică faptul că micromediul și interacțiunea dintre tumoră și țesutul din jur influențează puternic evoluția tumorii și eficacitatea răspunsului imun antitumoral. Astfel, am decis să privim în ansamblu câțiva implicați în această interacțiune, factori de asemenea responsabili pentru TEM.

Material și metodă

Am analizat 93 de melanoame diagnosticate în departamentul de anatomie patologică al Spitalului Clinic Colentina din ianuarie 2007 până în decembrie 2008. Criteriul de selecție a

Regression occurs with variable frequency, depending on stage and type of regression: partial regression is relatively common, occurring in 10–35% of all cases irrespective of stage and up to 60% of melanoma thinner than 0.75 mm) while complete regression is extremely rare (about 0.25% in large studies) [3–7].

Despite its frequency, no unanimous opinion exists about regression in melanoma concerning both biologic significance and prognosis. To date, several divergent opinions are expressed by different authors regarding prognosis and evolution of melanoma with regression: there are studies linking regression to a favorable prognosis [8,9], others identify an association with a poor prognosis [10-14] while others failed to associate any prognosis either favorable or unfavorable [3,15-17]. Neither are deciphered the biologic mechanisms involved in regression and also there is little data about the mechanisms used by some tumor cells to escape this otherwise specific immune response; despite these uncertainties, various lines of immunotherapy proved efficacy in oncologic treatment: ipilimumab in different cancers (metastatic melanoma [18], metastatic renal cell cancer [19] or metastatic pancreatic adenocarcinoma [20]), active immunization (cancer vaccines) [21,22] or adoptive cell transfer of activated immune cells [23,24]. The coexistence of regression and progression in the same tumor indicates that the microenvironment and the interaction between tumor and nearby tissue strongly influence the evolution of the tumor and the efficiency of antitumor immune response. Thus we decide to look in detail to several factors involved this interaction, factors also responsible for epithelial-mesenchymal transition (EMT).

Material and method

We analyzed 93 melanomas diagnosed in the Department of Pathology of Colentina University Hospital from January 2007 to December 2008. The criterion of selection was the histopathologic confirmed presence of cutaneous melanoma.

All the cases were received for histopathologic diagnosis; the fragments harvested during the grossing of the specimens were routinely processed and paraffin embedded. 3 μ sections were cut on; the sections were displayed

fost confirmarea histopatologică a prezenței melanomului cutanat.

Toate cazurile au fost primite pentru diagnosticul histopatologic; fragmentele recoltate în timpul examenului macroscopic al pieselor au fost procesate de rutină și incluse la parafină; au fost efectuate secțiuni de 3 μm; secțiunile au fost etalate pe lame obișnuite pentru colorații speciale și de rutină HE și pe lame pretratate pentru teste imunohistochimice. Din buletinele histopatologice am selectat câteva date precum tipul de melanom, tipul de regresie, nivelul Clark și indicele Breslow.

Au fost efectuate teste imunohistochimice (IHC) pentru metaloproteinazele (MMP) 1, MMP2, MMP3, MMP9, MMP11 și MMP13. Detaliile specifice privind clona, gazda, sursa, diluția și pretratamentul sunt enumerate în tabelul 1. Ca sistem de detecție am folosit Novolink Polymer (Leica/ Novocastra) și cromogen DAB.

Am evaluat nivelul de expresie pentru fiecare marker folosind un scor semicantitativ cu patru grade: „absent” (-), „slab pozitiv” (+), „moderat pozitiv” (++) , „intens pozitiv”(+++) în funcție de nivelul de intensitate al colorației.

on regular slides for routine and special stains and on precoated slides for immunohistochemical tests. From the histopathologic reports we selected several data including: type of melanoma, type of regression, Clark level and Breslow thickness.

Immunohistochemical (IHC) tests were performed for metalloproteinase (MMP) 1, MMP2, MMP3, MMP9, MMP11, MMP13. Specific details about clones, host, source, dilution and pretreatment are listed in Table 1. As detection system we used Novolink Polymer (Leica/ Novocastra) and DAB chromogen. Immunohistochemical stains were analyzed using a microscope Nikon 80i.

We evaluated the level of expression for each marker using a semiquantitative score with four levels „absent” (-), „mild positive” (+), „moderate positive”(++), „intense positive”(+++) depending on the level of the intensity of the staining.

The tumors were separated in two groups, based on the presence of regression, irrespective of type (partial or segmental) or its amount; the expression of each marker was assessed in the tumor cells from the tumor mass from melanoma without regression (absence of regression – AR) and in two parts of tumor in melanoma with

Tabelul 1. Caracteristicile anticorpilor primari

| No | Anticorpul primar | clona | gazda | sursa | pretratament* | diluția |
|----|-------------------|---------------|---------|----------------|----------------------------|---------|
| 1. | MMP1 | Policlonal | Iepure | Thermo Fischer | - | 0.3:250 |
| 2. | MMP2 | CA-4001 | Șoarece | Thermo Fischer | - | 0.3:250 |
| 3. | MMP3 | Policlonal | Iepure | Thermo Fischer | HIER, buffer citrate, pH 6 | 1:50 |
| 4. | MMP9 | 15W2 | Șoarece | Leica | HIER, buffer citrate, pH 6 | 2:240 |
| 5. | MMP11 | SL305 | Șoarece | Thermo Fischer | - | 1:100 |
| 6. | MMP13 | Collagenase-3 | Șoarece | Thermo Fischer | HIER, buffer citrate, pH 6 | 1:25 |

Table 1. Characteristics of primary antibodies

| No | Primary antibody | clone | host | source | pretratament* | dilution |
|----|------------------|---------------|--------|----------------|----------------------------|----------|
| 1. | MMP1 | Policlonal | Rabbit | Thermo Fischer | - | 0.3:250 |
| 2. | MMP2 | CA-4001 | Mouse | Thermo Fischer | - | 0.3:250 |
| 3. | MMP3 | Policlonal | Rabbit | Thermo Fischer | HIER, buffer citrate, pH 6 | 1:50 |
| 4. | MMP9 | 15W2 | Mouse | Leica | HIER, buffer citrate, pH 6 | 2:240 |
| 5. | MMP11 | SL305 | Mouse | Thermo Fischer | - | 1:100 |
| 6. | MMP13 | Collagenase-3 | Mouse | Thermo Fischer | HIER, buffer citrate, pH 6 | 1:25 |

Tumorile au fost împărțite în două grupuri, în funcție de prezența regresiei indiferent de tipul de regresie (parțială sau segmentară) sau de cantitate; expresia fiecărui marker a fost evaluată în celulele tumorale din masa tumorală fără regresie (absența regresiei - AR) și în două zone tumorale cu regresie (R) – în zonele fără regresie (componenta non-regresată a melanomului cu regresie – CNR) și în zonele cu regresie (componenta regresată a melanomului cu regresie – CR); în CR colorația a fost evaluată atât în celulele tumorale încă prezente în zonele de regresie parțială cât și în celulele tumorale din imediata vecinătate a zonelor de regresie segmentară. Tipul de regresie tumorală a fost stabilit pe baza următoarelor criterii: **regresia segmentară (RS)** – regresia completă a unui segment de melanom cu prezervarea concomitentă a celulelor tumorale în alte părți ale tumorii; **regresia parțială (RP)** – dispariția unei părți a masei tumorale fără înlocuirea completă a acesteia de celule inflamatorii, melanofage și fibroză [7].

Am comparat expresia fiecărui marker IHC din tabelul 1 în CNR versus CR în aceeași tumoră și în CNR versus AR. Pentru diferențele dintre CNR și CR am scăzut scorul IHC pentru CR din cel pentru CNR (de exemplu: CNR +++ și CR ++: CNR/CR = +1; CNR ++ și CR +++: CNR/CR = -1).

Datele au fost analizate statistic cu Microsoft Office Excel 2007 și EPIINFO; pentru analiza statistică am folosit testul χ^2 cu un nivel de semnificație statistică $P < 0.05$.

Rezultate

a) Date generale

Am identificat în lotul nostru 62 de cazuri de melanom extensiv în suprafață (MES) (66.66%) și 31 de cazuri de melanom nodular (MN) (33.33%). Regresia a fost identificată în cazurile de MES în 39 de tumori (62.90%) după cum urmează: RS 13 cazuri (33.33%), PR 17 cazuri (43.58%) și RS-RP în aceeași tumoră 9 cazuri (23.07%).

b) Expresia MMP

Expresia MMP în cazurile cu CNR versus AR.

MMP1 a fost supraexprimat în toate cazurile cu AR, atât în MN cât și în MES. 84.16% din cazurile cu regresie au prezentat pozitivitate intensă (+++) pentru MMP1 în CNR, restul de 15.84% având pozitivitate moderată. Tendința în

regresion (R) – in areas without regression (non-regressed component of the melanoma with regression – NRC) and in areas with regression (regressed component of the melanoma with regression – RC); in areas with regression (RC) the stain was evaluated either in tumor cells still present in areas of partial regression or in tumor cells located in the immediate vicinity of the areas of segmental regression. Type of regression was establishing based on these criteria: **segmentary regression (SR)** – complete regression of a segment of a CM with concomitant preservation of the tumor cells in other parts of tumor; **partial regression (PR)** – disappearance of parts of the tumor mass without complete replacement of the tumor by inflammatory cells, melanophages and fibrosis [7].

We compared the expression of each of the immunohistochemical markers listed in Table 1 in NRC versus RC in the same tumor and in NRC versus AR. For differences between NRC and RC component we subtracted the immunohistochemical score for RC from that of NRC (i.e.: NRC +++ and RC ++: NRC/RC = +1; NRC ++ and RC +++: NRC/RC = -1).

The data were statistically analyzed with Microsoft Office Excel 2007 and EPIINFO; for statistical analyses we used χ^2 test with a level of statistical significance $P < 0.05$.

Results

a) General data

We identified in our lot of cases 62 superficial spreading melanomas (SSM) (66.66%) and 31 nodular melanoma (NM) (33.33%). Regression was identified in SSM cases in 39 tumors (62.90%) as it follows: segmental regression (SR) 13 cases (33.33%), partial regression (PR) 17 cases (43.58%) and segmental and partial regression (SR-PR) in the same tumor 9 cases (23.07%).

b) MMPs expression

MMPs expression in NRC component versus AR cases.

MMP1 was over-expressed in all AR cases, either NM or SSM. 84.16% of cases with regression presented intense positivity (+++) for MMP1 in NRC, the remaining 15.84% being moderate positive. The tendency of reduced

reducerea expresiei MMP1 în CNR versus AR este semnificativ statistică ($P = 0.047$) (Fig. A). MMP11 a fost supraexprimat (+++) în toate cazurile cu AR, în timp ce pozitivitatea intensă a fost remarcată în CNR în 74.35% din cazuri. Supraexpresia MMP11 în AR versus CNR este de asemenea semnificativ statistică ($P = 0.029$, Fig. B). A fost o ușoară tendință de creștere a expresiei MMP2, MMP3 în AR comparativ cu CNR dar fără semnificație statistică. MMP13 a fost supra/exprimat în mai multe cazuri (94.87%) în AR decât în cazurile cu regresie (87.17%) dar diferențele nu au avut semnificație statistică ($P = 0.07$, Fig. C).

Cazurile prezentând RS sau RS-RP ca tip de regresie au prezentat o reducere semnificativă a MMP1 comparativ cu melanoamele cu AR (P RS/RA = 0.016; P RS-RP/AR = 0.003) sau cu melanoamele cu RP ca tip de regresie (P RS/RP = 0.030; P RS-RP/RP = 0.010) (Fig. D). Nu s-a observat o asociere cu tipul de regresie pentru MMP2, MMP3, MMP11 și MMP13.

Expresia MMP în zonele regresate și nonregresate din aceeași tumoră

Comparând expresia MMP1 în zonele regresate și nonregresate din aceeași tumoră, am identificat o ușoară supraexpresie a MMP1. În CNR în 30.76% din cazuri (MMP1 CNR vs CR +1), în timp ce 69.24% din cazuri nu au arătat diferențe în expresia MMP1. De asemenea, supraexpresia MMP13 a fost consemnată în 48.71% din cazuri (+1) în timp ce 51.29% din cazuri au avut o expresie similară a MMP13 în ambele componente. Pentru MMP2, MMP3 și MMP11, majoritatea cazurilor cu regresie au arătat o supraexpresie pentru MMP în CNR versus CR (supraexpresia MMP2 CNR/CR 58.97% – Fig. E, supraexpresia MMP3 CNR/CR 76.93% – Fig. F, supraexpresia MMP11 CNR/CR 58.97% – Fig. G).

Am căutat de asemenea o asociere patternul de expresie al MMP și un tip particular de regresie. A fost o tendință de asociere a supraexpresiei MMP1 cu tipul parțial de regresie (supraexpresia MMP1 în CNR în RP 47.05% în timp ce același fenomen a fost prezent în 30.67% din cazurile cu RS) dar diferențele nu au fost semnificative statistic. MMP2 a fost supraexprimat în CNR a tumorii cu CR în cazurile cu RP (64.70%) comparativ cu RS (23.07%) (Fig H, $P = 0.023$). Nu a fost evidențiată o diferență semnificativ statistică când am comparat expresia MMP3 și MMP11 în CNR versus CR în diferite tipuri de

expresion of MMP1 in NRC versus AR cases is statistically significant ($P = 0.047$) (Fig. A). MMP11 was also over-expressed (+++) in all AR cases, while intense positivity was noted in NRC in 74.35% of cases. Overexpression of MMP11 in AR versus NRC cases is also statistically significant ($P = 0.029$, Fig. B). There was a slight tendency of increased expression of MMP2, MMP3 in AR than NRC but without statistical significance. MMP13 was expressed in more numerous cases (94.87%) in AR than cases with regression (87.17%) but the differences were not statistically significant ($P = 0.07$, Fig C).

Cases presenting SR or SR-PR type of regression showed significantly reduced expression of MMP1 comparing with AR melanomas (P SR/AR = 0.016; P SR-PR/AR = 0.003) or with melanomas with PR type of regression (P SR/PR = 0.030; P SR-PR/PR = 0.010) (Fig. D). No association with the type of regression was noted for MMP2, MMP3, MMP11 and MMP13.

MMPS expression in regressed and non-regressed areas in the same tumor

Comparing MMP1 expression in regressed and non-regressed areas in the same tumor, we identified mild over-expression of MMP1 in NRC in 30.76% of cases (MMP1 NRC vs RC +1), while 69.24% of cases showed no difference in MMP1 expression. Also, MMP13 overexpression was noted in 48.71% of the cases (+1) while 51.29% of cases had similar expression of MMP13 in both components. For MMP2, MMP3 and MMP11, most of the cases with regression showed overexpression of MMPs in NRC versus RC (MMP2 overexpression NRC/RC 58.97% – Fig E, MMP3 overexpression NRC/RC 76.93% – Fig F, MMP11 overexpression NRC/RC 58.97% – Fig G).

We looked also for an association between the pattern of MMPs expression and a particular type of regression. There was a tendency to associate MMP1 over-expression with partial type of regression (overexpression of MMP1 in NRC in PR cases 47.05% while same phenomenon was present in 30.67% of SR cases) but the differences were not significant. MMP2 was over-expressed in NRC part of the tumor than in RC in PR cases (64.70%) than SR ones (23.07%) (Fig H, $P = 0.023$). No significant differences occurred when comparing MMP3 and MMP11 expression in

regresie. Interesant este faptul că MMP13 a fost supraexprimat în CNR versus CR în toate cazurile cu RS-RP în timp ce majoritatea cazurilor cu RS (76.92%) și cele cu RP (58.82%) au avut o expresie similară a MMP13 în ambele componente (P RS/RS-RP = 0.0003; P RP/RS-RP = 0.003. Fig. I).

NRC vs RC in different types of regression. Interestingly, MMP13 was over-expressed in NRC vs RC in all SR-PR cases while most of the SR cases (76.92%) and PR ones (58.82%) had similar expression of MMP13 in both component (P SR/SR-PR = 0.0003; P PR/SR-PR = 0.003. Fig. I).

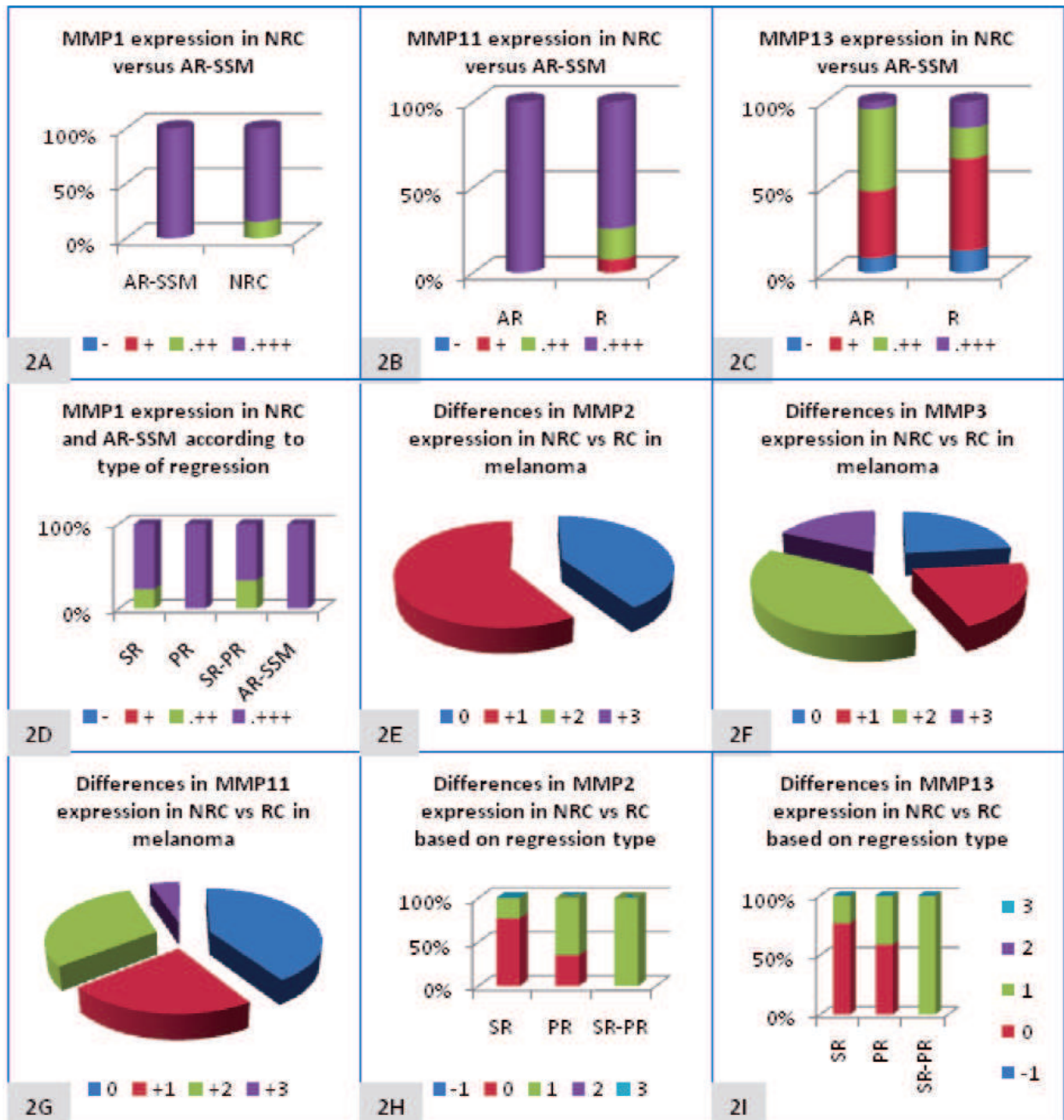


Figura 1 A-I / Figure 1 A-I

Discuții

TEM este un proces funcțional progresiv care apare în normal în timpul dezvoltării embrionare; postpartum, are loc de asemenea, normal, în repararea cicatricială. În ambele situații constă în transformarea unei celule epiteliale într-o celulă mezenchimală cu două caracteristici principale: mobilitate și capacitate de a secreta componente ale matricei extracelulare (MEC). Structural, celulele epiteliale pierd joncțiunile intercelulare, degradează membrana bazală și migrează în lamina proprie subiacentă; acest proces poate fi urmărit pe baza modificărilor imunofenotipice (pierderea citokeratinelor, e-cadherinei, lamininei 1, zonula ocludens 1 etc și dobândirea vimentinei, actinei de mușchi neted alpha, fibronectinei, N-caderinei, beta-cateninei etc [25]. TEM este de asemenea implicată în progresia tumorală; capacitatea celulelor epiteliale neoplazice de a invada local și de a metastaza este bazată pe alterările TEM [26].

Am ales să investigăm MMP atât ca puncte nodale în TEM cât și ca biomolecule implicate în reglarea de căi moleculare și procese celulare.

Matrix metalloproteinazele (MMP) sunt endopeptidaze Ca și Zn cu funcții biochimice complexe, fiind implicate atât în degradarea proteinelor matricei extracelulare cât și în modularea moleculelor bioactive; ele egalează multiple căi de semnalizare prin activarea chemokinelor, degradarea receptorilor membranari sau eliberarea moleculelor apoptotice [27-29]. Alterarea funcțiilor MMP produce anomalii tisulare la nivel matricial și fibrilar; Dereglarea MMP este responsabilă pentru o varietate de procese patologice precum repararea cicatricială, boli cardiovasculare (ateroscleroza, anevrismul aortic), boli degenerative cerebrale, ciroza, artrita, boli periodontale [30-32]. În cancer, MMP facilitează invazia și metastazarea prin intermedierea adeziunii celulare tumorale de structurile matricei extracelulare, proteoliza matricei extracelulare și ulterior migrarea celulelor tumorale în ariile degradate [33]; de asemenea contribuie la crearea unui mediu local capabil să furnizeze condiții propice pentru ca celulele tumorale să supraviețuiască în organul care găzduiește metastaza ("nișa metastatică") [34]. De asemenea, MMP se comportă ca mediatori bioactivi și astfel reglează proliferarea, apoptoza,

Discussions

EMT is a progressive functional process that normally occurs during embryologic development; postpartum, it also normally occurs during wound healing. In both instances it consists in transformation of an epithelial cell into a mesenchymal cell with two main characteristics: mobility and ability to secrete extracellular matrix (ECM) components. Structurally the epithelial cells losses intercellular junctions, degrades the basement membrane and migrates into subjacent lamina propria; this process can be followed based on immunophenotypic changes (loss of cytokeratins, e-cadherin, laminin 1, zonula ocludens 1 etc and acquiring of vimentin, alpha-smooth muscle actin fibronectin, N-caderin, beta-catenin etc [25]. EMT is also involved in tumor progression; neoplastic epithelial cells capacities to locally invade and metastasis are based on alterations of EMT [26].

We choose to investigated MMPs as both nodal points in EMT and biomolecules involved in regulating different pathways and cellular processes.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are Ca and Zn endopeptidases with complex biochemical functions, being involved both in degrading extracellular matrix proteins and in modulating bioactive molecules; they regulate multiple signaling pathways by activating chemokines, degrading membrane receptors or releasing apoptotic molecules [27-29]. MMPs functions alterations produce tissue anomalies on matricial or fibrillar level; MMPs deregulation is responsible for a variety of pathological processes such as abnormal wound healing, cardiovascular diseases (atherosclerosis, aortic aneurysm), brain degenerative diseases, cirrhosis, arthritis, periodontal diseases [30-32]. In cancer, MMPs facilitate invasion and metastasis by intermediating tumor cell adhesion to extracellular matrix structures, proteolysis of extracellular matrix and subsequent migration of tumor cells into the degraded area [33]; also they contribute to the creation of a local environment able to provide suitable conditions for the tumor cells to survive in the organ that host the metastasis ("metastatic niche") [34]. Also, MMPs act as bioactive mediators and thus regulate proliferation, apoptosis,

diferențierea, angiogeneza și rezistența la procesele imune antitumorale [35-38].

Relația MMP cu melanomul nu este integral descifrată. În majoritatea cazurilor, expresia MMP se corelează cu agresivitatea tumorală [39]. Expresia MMP1 în melanom a fost corelată cu capacitățile metastatice și invazive [40,41] dar și cu un răspuns favorabil la chimioterapie [42]; de asemenea, nivelurile serice ridicate de MMP1 la pacienții cu melanom se corelează cu progresia rapidă a bolii [43]. Expresia MMP3 a fost corelată cu o supraviețuire scăzută la pacienții cu melanom [44]. Expresia MMP13 este prezentă în melanoamele invazive în timp ce tumorile benigne melanocitare sunt negative [45]; de asemenea, studiile in vitro au arătat intervenția MMP13 în progresia ciclului celular, jucând astfel un rol în progresia melanomului [46]. MMP2 este exprimat atât în melanom cât și în celulele stromale fără a evidenția o legătură cu un anumit prognostic [47].

Studiul nostru a arătat o diminuare globală a expresiei MMP1 și MMP11 în CNR comparativ cu corespondentul cu AR, astfel fiind probabil favorizat un comportament agresiv mai scăzut în aceste cazuri. De asemenea, regresia în melanom este corelată cu diminuarea expresiei MMP2, MMP3 și MMP11 în CNR decât în CR.

Anumite tipuri de regresie au asociat alterări specifice în expresia MMP. Melanomul cu RS (atât RS izolată sau în conjuncție cu RP RS-RP) a prezentat o expresie semnificativ mai scăzută a MMP1 comparativ cu melanoamele cu AR.

Melanomul cu PR ca tip de regresie a supraexprimat MMP2 în CNR comparativ cu CR; de asemenea, CNR a supraexprimat MMP13 comparativ cu CR în melanoamele cu RS-RP ca tip de regresie.

Toate aceste date au arătat că expresia tuturor acestor markeri este extrem de variabilă. Tehnic, am identificat un polimorfism semnificativ al tumorii în ceea ce privește expresia MMP; totuși, este un subtip de melanom cu regresie ce arată un pattern de expresie sugestiv pentru un prognostic mai bun. De fapt, datele recente dintr-o serie mare de pacienți susțin relevanța regresiei ca un factor de prognostic favorabil independent, cel puțin în melanoamele din stadiile I-II AJCC [48].

Am studiat în prealabil regresia în melanom pe baze morfologice și am concluzionat că sunt

diferențierea, angiogeneza și rezistența la procesele imune antitumorale [35-38].

MMPs relation with melanoma is not entirely deciphered. In most cases, MMPs expression correlates with tumor aggressivity [39]. MMP1 expression in melanoma was correlated with invasive and metastatic capacities [40,41] but also with favorable response to chemotherapy [42]; also, elevated serum levels of MMP1 in patients with melanoma correlates with rapid disease progression [43]. MMP3 expression was correlated with short survival in patients with melanoma [44]. MMP13 expression is present in invasive melanomas while benign melanocytic tumors are negative [45]; also, in vitro studies show intervention of MMP13 in cell cycle progression, thus playing a role in melanoma progression [46]. MMP2 is expressed both in melanoma and stromal cells without evidence towards a link to a certain prognosis [47].

Our study showed an overall diminished expression of MMP1 and MMP11 in non-regressed tumor comparing to AR counterpart, thus maybe favoring a less aggressive biologic behavior for those cases. Also, regression in melanoma is correlated with diminished expression of MMP2, MMP3 and MMP11 in regressed component than in non-regressed one.

Certain type of regression associated specific alterations in MMPs expression. Melanoma with segmental regression (either isolated SR or in conjunction with partial regression SR-PR) presented significant less expression of MMP1 than melanoma AR.

Melanoma with PR type of regression over-expressed MMP2 in NRC comparing with RC; also, NRC over-expressed MMP13 comparing with RC in melanomas with SR-PR type of regression.

All these data show that there is highly variability in expression of all of these markers. Technically, we identified significant polymorphism of tumor in respect of MMPs expression; however, there is a subtype of melanoma with regression showing a pattern of expression suggestive of better prognosis. In fact, recent data form a large series of patients support the independent favorable prognostic relevance of regression, at least in stage I-II AJCC melanomas [48].

diferite procese care implică inflamația și distrucția celulelor tumorale, regresia parțială și segmentară părând că aparțin unui spectru de alterare diferit, ultima având un potențial mai favorabil prognostic [7]. Cazurile cu RS au prezentat diminuarea expresiei MMP1 în CNR comparativ cu cazurile cu AR (potențial mai puțin agresiv); totuși, întrucât rolul MMP2 în progresia melanomului este necunoscută, nu putem specula privind semnificația acestor rezultate.

De fapt, regresia (dispariția spontană a celulelor tumorale și înlocuirea lor cu infiltrat inflamator) ar putea reprezenta un factor de prognostic favorabil. Totuși, așa cum am menționat anterior există o lipsă de consens privind semnificația biologică a regresiei în melanom, unele opinii legând regresia de un prognostic favorabil în timp ce altele, exact opusul, de un prognostic nefavorabil. Datele noastre arată că există tipuri diferite de regresie; de asemenea, am arătat că în melanomul cu regresie există diferite clone tumorale, în unele cazuri regresia din tumoră obține un răspuns potențial favorabil în masa tumorală non-regresată. Toate aceste rezultate susțin ipoteza că există un tip specific de melanom în curs de regresie cu o evoluție favorabilă.

Concluzii

Am descris diferențe de expresie a mai multor biomolecule legate de TEM în ariile regresate și în ariile non-regresate din melanomul cu regresie (cu tendința de reducere a expresiei MMP1, MMP2, MMP3, MMP11, MMP13 în zonele non-regresate ale melanomului cu regresie când sunt comparate cu melanoamele fără regresie (CNR versus AR)); de asemenea, a existat o tendință spre diminuarea expresiei MMP1, MMP2, MMP3, MMP11, MMP13 în ariile regresate versus non-regresate (CR versus CNR). De fapt, studiile noastre au demonstrat imunofenotipuri diferite în ariile cu regresie și fără regresie în melanom, ultimele fiind mai similare cu melanomul fără regresie; astfel am identificat regresia în melanom ca expresie a heterogenității intratumorale, unele forme de regresie având o semnificație prognostică mai favorabilă.

We previously studied regression in melanoma on a morphologic basis and concluded that there are various processes comprising inflammation and tumor cells destruction, partial and segmental regression seeming to belong to different spectrum of alteration, the latter bearing a more favorable potential [7]. SR cases present diminished expression of MMP1 in NRC than AR cases (potentially less aggressive); however, since the role of MMP2 in melanoma progression is unknown we cannot speculate about the significance of these results.

In fact, regression (spontaneous disappearance of tumor cells and replacement by inflammatory infiltrate) should represent a good prognostic factor. However, as we previously stated there is a definite lack of consensus in biologic significance of regression in melanoma, some opinions relating regression to a favorable prognosis while other, exactly the opposite, to an unfavorable one. Our own data showed that there are different types of regression; also, we shown that in melanoma with regression there are different clones of tumor, in some cases regression within the tumor eliciting a potentially favorable inflammatory response within non-regressed tumor mass. All these findings support the hypothesis that there is a specific type of melanoma undergoing regression with favorable evolution.

Conclusions

We described differences in expression of several EMT-related biomolecules in regressed areas and non-regressed areas of melanoma with regression (with a tendency towards reduced expression of MMP1, MMP2, MMP3, MMP11, MMP13 in non-regressed areas of melanoma with regression when compared with melanomas without regression (NRC versus AR)); also, there was a tendency towards and a reduced expression of MMP1, MMP2, MMP3, MMP11, MMP13 in regressed versus non-regressed areas (RC vs NRC). In fact, our studies demonstrated different immunophenotype in areas with regression and without regression in melanoma, the latter being more similar to melanoma without regression; thus we identified regression in melanoma as expression of intra-tumor

Datele noastre curente și stabilite anterior despre diversitatea regresiei în melanom (ambele sub aspect morfologic, al infiltratului imun celular și al imunofenotipului celulelor tumorale), coroborate cu opinia divergentă despre semnificația prognostică a regresiei indică faptul că există o categorie identificabilă de melanoame cu regresie cu un prognostic mai favorabil și, mai mult, predispusă la chimio și imunoterapia specifică.

heterogeneity, some forms of regression bearing more favorable prognostic significance.

Our current and previously established data about diversity of regression in melanoma (both in morphologic appearance, immune cells infiltration and tumor cells immunophenotype), corroborated with the divergent opinion about prognostic significance of regression indicate that there is an identifiable category of melanomas with regression with more favorable prognosis and, moreover, prone to specific chemo and/or immunotherapy.

Bibliografie/ Bibliography

- Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK, Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification, *J Clin Oncol*, 2009, 27 (36):6199-6206.
- NCCN clinical practice guidelines in oncology, Melanoma version 2.2013,
- Alquier-Bouffard A, Franck F, Joubert-Zakeyh J, Barthélémy I, Mansard S, Ughetto S, Aublet-Cuvelier B, Déchelotte PJ, Mondié JM, Souteyrand P, D'incan M, [Regression in primary cutaneous melanoma is not predictive for sentinel lymph node micrometastasis], *Ann Dermatol Venereol*, 2007, 134:521-525
- McGovern VJ, Shaw HM, Milton GW, Prognosis in patients with thin malignant melanoma: influence of regression, *Histopathology*, 1983, 7(5):673-680
- Abramova L, Slingluff CL Jr, Patterson JW, Problems in the interpretation of apparent "radial growth phase" malignant melanomas that metastasize, *J Cutan Pathol*, 2002, 29(7):407-414
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF, Final version of the American joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma, *J Clin Oncol* 2001, 19(16):3635-3648
- Zurac S, Negroiu G, Petrescu S, Andrei R, Tebeica T, Popp C, Mustată R, Neagu M, Constantin C, Solovan C, Chițu V, Reboșapcă A, Andreescu B, Marinescu I, Stăniceanu F, Spectrum of morphologic alterations of regression in cutaneous melanoma—potential for improving disease prognosis, *Rom J Intern Med*, 2012, 50(2):145-153.
- Trau H, Kopf AW, Rigel DS, Levine J, Rogers G, Levenstein M, Bart RS, Mintzis MM, Friedman RJ. Regression in malignant melanoma, *J Am Acad Dermatol*, 1983, 8(3):363-368.
- Kaur C, Thomas RJ, Desai N, Green MA, Lovell D, Powell BW, Cook MG, The correlation of regression in primary melanoma with sentinel lymph node status, *J Clin Pathol*, 2008, 61(3):297-300
- Shaw HM, Rivers JK, McCarthy SW, McCarthy WH, Cutaneous melanomas exhibiting unusual biologic behavior, *World J Surg*, 1992, 16(2):196-202.
- Guitar J, Lowe L, Piepkorn M, Prieto VG, Rabkin MS, Ronan SG, Shea CR, Tron VA, White W, Barnhill RL, Histological characteristics of metastasizing thin melanomas: a case-control study of 43 cases, *Arch Dermatol*, 2002, 138(5):603-608.
- Blessing K, McLaren KM, Histological regression in primary cutaneous melanoma: recognition, prevalence and significance, *Histopathology*, 1992, 20:315-322.
- Paladugu RR, Yonemoto RH, Biologic behavior of thin malignant melanomas with regressive changes, *Arch Surg*, 1983, 118:41-44.
- Oláh J, Gyulai R, Korom I, Varga E, Dobozy A, Tumour regression predicts higher risk of sentinel node involvement in thin cutaneous melanomas, *Br J Dermatol*, 2003, 149(3):662-663.

15. Socrier Y, Lauwers-Cances V, Lamant L, Garrido I, Lauwers F, Lopez R, Rochaix P, Chevreau C, Payoux P, Viraben R, Paul C, Meyer N, Histological regression in primary melanoma: not a predictor of sentinel lymph node metastasis in a cohort of 397 patients. *Br J Dermatol*, 2010, 162(4):830-834.
16. Fontaine D, Parkhill W, Greer W, Walsh N, Partial regression of primary cutaneous melanoma: is there an association with sub-clinical sentinel lymph node metastasis? *Am J Dermatopathol*, 2003, 25(5):371-376.
17. Liskay G, Orosz Z, Péley G, Csuka O, Plótár V, Sinkovics I, Bánfalvi T, Fejös Z, Gilde K, Kásler M, Relationship between sentinel lymph node status and regression of primary malignant melanoma, 2005, 15(6):509-513
18. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DE, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma, *N Engl J Med*, 2010, 363(8):711-723.
19. Yang JC, Hughes M, Kammula U, Royal R, Sherry RM, Topalian SL, Suri KB, Levy C, Allen T, Mavroukakis S, Lowy I, White DE, Rosenberg SA, Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis, *J Immunother*, 2007, 30(8):825-830
20. Royal RE, Levy C, Turner K, Mathur A, Hughes M, Kammula US, Sherry RM, Topalian SL, Yang JC, Lowy I, Rosenberg SA, Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma, *J Immunother*, 2010, 33(8):828-833
21. Klebanoff CA, Acquavella N, Yu Z, Restifo NP, Therapeutic cancer vaccines: are we there yet? *Immunol Rev*, 2011, 239(1):27-44.
22. Faries MB, Morton DL, Therapeutic vaccines for melanoma: current status, *BioDrugs*, 2005, 19(4):247-260.
23. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA, Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes, *Science*, 2006, 314(5796):126-129.
24. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME, Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy, *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(4):299-308.
25. Kalluri R, Weinberg RA, The basics of epithelial-mesenchymal transition, *J Clin Invest*, 2009, 119(6):1420-1428.
26. Hanahan D, Weinberg RA, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 2011, 144(5):646-674
27. Morrison CJ, Butler GS, Rodríguez D, Overall CM, Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy, *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(5):645-653.
28. Butler GS, Overall CM, Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new "intracellular" substrates revealed by degradomics, *Biochemistry*, 2009, 48(46):10830-10845.
29. Mannello F, Luchetti F, Falcieri E, Papa S, Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis, *Apoptosis*, 2005, 10(1):19-24.
30. Milner JM, Cawston TE, Matrix metalloproteinase knockout studies and the potential use of matrix metalloproteinase inhibitors in the rheumatic diseases, *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005, 4:363-375.
31. Seiki M, Membrane-type matrix metalloproteinases, *APMIS*, 1999, 107:137-143.
32. Mannello F, Medda V, Nuclear localization of matrix metalloproteinases, *Prog Histochem Cytochem*, 2012, 47(1): 27-58.
33. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK, Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting, *FEBS J*, 2011, 278(1):16-27.
34. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z, Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment, *Cell*, 2010, 141(1):52-67
35. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z, Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment, *Cell*, 2010, 141(1):52-67
36. Struyf S, Proost P, Vandercappellen J, Dempe S, Noyens B, Nelissen S, Gouwy M, Locati M, Opdenakker G, Dinsart C, Van Damme J, Synergistic up-regulation of MCP-2/CCL8 activity is counteracted by chemokine cleavage, limiting its inflammatory and anti-tumoral effects, *Eur J Immunol*, 2009, 39(3):843-857.
37. Ogbureke KU, Abdelsayed RA, Kushner H, Li L, Fisher LW, Two members of the SIBLING family of proteins, DSPP and BSP, may predict the transition of oral epithelial dysplasia to oral squamous cell carcinoma, *Cancer*, 2010, 116(7):1709-1717.
38. Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Fisher LW, Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases, *FASEB J*, 2004, 18(6):734-736.
39. Hernández-Pérez M, Mahalingam M, Matrix Metalloproteinases in Health and Disease: Insights From Dermatopathology, *Am J Dermatopathol*, 2012, 34(6):565-579.

40. Blackburn JS, Rhodes CH, Coon CI, Brinckerhoff CE, RNA interference inhibition of matrix metalloproteinase-1 prevents melanoma metastasis by reducing tumor collagenase activity and angiogenesis, *Cancer Res*, 2007, 67(22):10849-10858.
41. Airola K, Karonen T, Vaalamo M, Lehti K, Lohi J, Kariniemi AL, Keski-Oja J, Saarialho-Kere UK, Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas, *Br J Cancer*, 1999, 80(5-6):733-743.
42. Nikkola J, Vihinen P, Vlaykova T, Hahka-Kemppinen M, Kähäri VM, Pyrhönen S, High collagenase-1 expression correlates with a favourable chemoimmunotherapy response in human metastatic melanoma, *Melanoma Res*, 2001, 11(2):157-66.
43. Nikkola J, Vihinen P, Vuoristo MS, Kellokumpu-Lehtinen P, Kähäri VM, Pyrhönen S, High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma, *Clin Cancer Res*, 2005, 11(14):5158-5166.
44. Nikkola J, Vihinen P, Vlaykova T, Hahka-Kemppinen M, Kähäri VM, Pyrhönen S, High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma, *Int J Cancer*, 2002, 97(4):432-438.
45. Corte MD, Gonzalez LO, Corte MG, Quintela I, Pidal I, Bongera M, Vizoso F, Collagenase-3 (MMP-13) expression in cutaneous malignant melanoma, *Int J Biol Markers*, 2005, 20(4):242-248.
46. Meierjohann S, Hufnagel A, Wende E, Kleinschmidt MA, Wolf K, Friedl P, Gaubatz S, Scharl M, MMP13 mediates cell cycle progression in melanocytes and melanoma cells: in vitro studies of migration and proliferation, *Mol Cancer*, 2010, 9:201.
47. Simonetti O, Lucarini G, Brancorsini D, Nita P, Bernardini ML, Biagini G, Offidani A, Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions, *Cancer*, 2002, 95(9):1963-1970.
48. Ribero S, Osella-Abate S, Sanlorenzo M, Savoia P, Astrua C, Cavaliere G, Tomasini C, Senetta R, Macripò G, Bernengo MG, Quaglino P, Favourable Prognostic Role Of Regression Of Primary Melanoma In Stage I-II AJCC Patients, *Br J Dermatol*, 2013, Aug 17. doi: 10.1111.

Conflict de interese
NEDECLARATE

Conflict of interest
NONE DECLARED

Persoana pentru corespondență:

Răzvan Andrei
Spitalul Clinic Colentina, Departamentul de Anatomie Patologică, corp K,
Șoseaua Ștefan cel Mare nr. 19 - 21, cod 020125, Sector 2, București; tel. 0744508013;
razvan_andrei_13@yahoo.com

Corresponding Author:

Răzvan Andrei
Colentina Clinical Hospital, Department of Histopathology, corp K, 19 – 21
Ștefan cel Mare str., post code 020125, Sector 2, Bucharest; tel.0744508013;
razvan_andrei_13@yahoo.com