



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00365**

(22) Data de depozit: **24/06/2021**

(41) Data publicării cererii:  
**29/10/2021** BOPI nr. **10/2021**

(71) Solicitant:  
• **SPITALUL CLINIC COLENTINA  
BUCUREȘTI, ȘOS.ȘTEFAN CEL MARE,  
NR.19-21, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL  
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR  
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ",  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 99-101,  
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **ZURAC SABINA ANDRADA, STR. TOPAZ  
NR. 5D, BRAGADIRU, IF, RO;**  
• **NEAGU MONICA,  
STR.ALECU MATEEVICI NR.5, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **CONSTANTIN CAROLINA,  
STR.TEIUL DOAMNEI NR.13, BL.36, SC.1,  
AP.27, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO**

### (54) **CLONĂ DE CELULE PRIMARE IZOLATE DINTR-O TUMORĂ RARĂ DE MELANOM DEZVOLTAT PE NEV ALBASTRU**

#### (57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de izolare a unei culturi celulare primare de melanom dezvoltat pe nev albastru (MDNA) utilizată ca model de celule tumorale de testare a unor compuși cu potențial terapeutic și/sau de identificare a unor markeri asociați procesului tumoral. Metoda, conform invenției, constă în etapele de: rezecția totală a unei formațiuni tumorale, prelucrarea histopatologică a tumorii rezectate prin deshidratare, clarificare și impregnare cu parafină printr-o procedură automată, spălare piese cu apă curentă și introducerea în histoprosesor conform protocolului de lucru, pentru

analiza privind diagnosticul histopatologic de melanom dezvoltat pe nev albastru, urmează prelucrarea fragmentului tumoral în mediu de cultură suplimentat cu antibiotic-antimicotic, menținut peste noapte la 4°C, stabilirea culturii de celule primare de melanom și stocarea în azot lichid, astfel că poate fi multiplicată in vitro pentru derularea studiilor de biologie celulară și moleculară a MDNA.

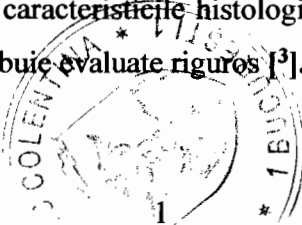
Revendicări: 3  
Figuri: 7



## DESCRIEREA INVENȚIEI

Prezenta invenție cu titlul **Clona de celule primare izolate dintr-o tumoră rară de melanom dezvoltat pe nev albastru** face referire la o metodă de izolare a unei culturi celulare primare de melanom dezvoltat pe nev albastru (MDNA) în scopul obținerii unui model celular unic, util pentru clarificarea caracteristicilor MDNA, a diagnosticului, pentru testarea *in vitro* a eficienței unor agenți cu potențial (imuno)terapeutic, și/sau util în caracterizarea unor markeri (genomici, proteomici) într-un context cât mai relevant din punct de vedere fiziologic.

Stadiul actual al cunoștințelor în domeniu este prezentat în **literatura de specialitate** prin extrem de puține publicații referitoare la MDNA în general, și la posibilitatea izolării și menținerii unei culturi celulare primare din acest tip de melanom în special. Nevul albastru malign, melanomul asociat nevilui albastru și melanomul dezvoltat pe nev albastru sunt termenii utilizați pentru a descrie melanoamele maligne care apar din, în asociere cu, sau asemănătoare nevilor albaştri. Astfel de cazuri raportate sunt doar de ordinul zecilor, de exemplu un studiu derulat în 2017 a relevat doar 91 de cazuri care corespund acestor criterii. Vârsta medie în momentul diagnosticului este de 45 de ani, cazurile metastatice au fost raportate la 55% iar grosimea medie Breslow a fost de 6,8 mm în momentul diagnosticului pentru 43% din cazuri. Criteriile histologice pentru diagnosticare sunt încă slab definite și pot contribui la confuzia terminologiei [1]. În plus, melanoamele cutanate prezintă o varietate de caracteristici histopatologice și alterări genetice iar cele care apar în cadrul nevilor albaştri, denumite și „nev albastru malign” sau melanom *ex nev albastru* (MBN), au un profil histopatologic și mutațional similar cu melanomul uveal. De regula melanoamele uveale prezintă mutații caracteristice *GNA11* sau *GNAQ*, iar alterarea suplimentară *BAP1* este asociată cu cel mai mare risc de metastazare și cu cel mai sumbru prognostic. Semnificația deleției *BAP1* în melanoamele *ex nev albastru* rămâne neclară fiind necesare cercetări suplimentare [2]. Un diagnostic precis al leziunilor melanocitare necesită o evaluare histopatologică aprofundată, corelată cu rezultatele examinării clinice. Deși aceste leziuni pot fi clasificate și definite în conformitate cu criterii diagnostice bine stabilite, subsetul de leziuni melanocitare cu morfologie albastră de tip nev, constituie o provocare continuă pentru patologi. Aceste leziuni sunt rare și prezintă adesea ambiguități histologice, cu caracteristici atât de benignită, cât și de malignitate, ceea ce face dificilă evaluarea precisă a riscului și predicția comportamentelor lor biologice. De aceea, pentru o abordare practică și sistematică pentru diagnosticul leziunilor melanocitare cu morfologie rară, caracteristicile histologice și imunofenotipice care ajută la distingerea unei entități de alta trebuie evaluate riguros [3].


Cele mai recente cunoștințe despre MDNA din literatura de specialitate coroborate cu experiența noastră în imuno-dermato-oncologie au condus la elaborarea acestui model celular ca instrument auxiliar în managementul/abordarea tumorilor rare de MDNA.

Astfel metoda propusă prin prezenta invenție contribuie la lărgirea instrumentelor inovative de testare și caracterizare a acestui tip rar de cancer, oferind simultan un model de testare a unor compuși cu potențial terapeutic și/sau de identificare a unor markeri asociați procesului tumoral. Cu ajutorul acestei metode propuse se obține o cultură de celule tumorale care poate fi menținută și multiplicată *in vitro* pentru derularea studiilor de biologie celulară și moleculară a MDNA, și poate aduce informații suplimentare echivalente biopsiilor cutanate care nu se practică în diagnosticul de melanom. Cultura celulară poate fi stocată în azot lichid pentru experimente ulterioare și poate constitui un element celular valoros în Biobanca celulară. În acest mod, se pot realiza caracterizări (imuno)histologice sau testări de biologie celulară și moleculară în dinamică, eludând recoltarea în mod repetat de material biologic de la pacient, tehnica ne-recomandată în melanom ca procedeu invaziv de recoltare a piesei biologice. În ansamblu cultura celulară realizată rezolvă problemele multiple generate de raritatea MDNA.

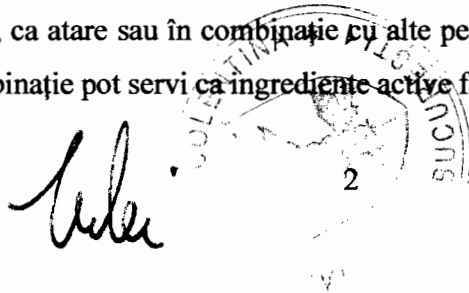
**Literatura de brevete** prezintă date referitoare la **melanom în general** precum metode de testare a unor noi compuși terapeutici, combinații de terapii, modulări celulare etc., **dar nu face** referire la melanomul dezvoltat pe un nev albastru.

De exemplu, brevetul US2019/0030023 A1 [4] se referă la metode de a trata cancerul inclusiv melanomul metastatic, în care compusul X4P-001 este administrat ca monoterapie sau în combinație cu inhibitori ai punctelor de control imun - pembrolizumab, rezultatele relevând inclusiv regresia bolii cu toxicitate minimă pentru organism.

Un alt brevet referitor la melanom US 2012/0128714 A1 [5] descrie modalitatea de a genera răspuns imun anti-tumoral în melanom prin exprimarea indusă a unor antigene tumorale (DCT, TRP2) rezultate în urma administrării unei compoziții farmaceutice pe baza de particule alfavirale derivate din virusul encefalitei cabaline Venezuelene.

Din brevetul în domeniul cancerelor cutanate US7001600 B1 [6] este cunoscută o modalitate de a sensibiliza ținta tumorală prin exprimarea unui antigen specific înrudit cu TRP-2, pentru a induce capacitatea anti-tumorală a limfocitelor T citotoxice.

Alt brevet din domeniul oncologiei [7] face referire la imunoterapia cancerului, inclusiv a melanomul cutanat. Invenția prezintă date legate de peptidele-epitop de la nivelul limfocitelor T asociate tumorii, ca atare sau în combinație cu alte peptide asociate tumorii; aceste peptide simple sau în combinație pot servi ca ingrediente active farmaceutic în compoziții de vaccinuri





ce pot stimula răspunsurile imune anti-tumorale, sau pot stimula *ex vivo* limfocitele T ce vor fi ulterior transferate terapeutic pacienților cu tumori solide.

Datele științifice descrise în literatura de brevete precum și în literatura de specialitate au constituit argumente care au susținut stabilirea unei metode de izolare a unei culturi celulare primare de melanom dezvoltat pe nev albastru, în scopul obținerii unui model unic util pentru testarea *in vitro* a eficienței unor agenți cu potențial terapeutic și/sau util în caracterizarea unor markeri (genomici, proteomici) într-un context cât mai relevant din punct de vedere fiziologic.

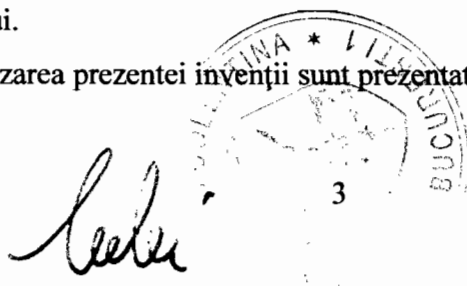
Aspectele tehnice pe care invenția prezintă urmărește să le rezolve au în vedere următoarele:

- Metoda de izolare și stabilire de culturi primare din melanom propusă de noi reprezintă o alternativă mai puțin costisitoare și mai relevantă fiziologic, de utilizat în studiul tumorilor cutanate, comparativ cu alte modele celulare bi- sau tridimensionale.
- Datele din literatura de specialitate recentă vin în sprijinul invenției propuse, deoarece se conturează clar necesitatea de a contribui prin modele alternative la caracterizarea complexă a acestui subtip de melanom rar, de a ajuta diagnosticul și/sau de a testa noi compuși potențial terapeutici. Modelele de culturi cu celule primare tumorale lipsesc în acest gen de demersuri experimentale la nivelul MDNA.
- Culturile tumorale primare transpun mult mai fidel contextul fiziologic asigurând astfel *in vitro* condiții și parametri care reproduc cu acuratețe semnificativă micromediul tumoral.

Prin urmare, invenția urmărește să rezolve următoarele probleme:

- Obținerea unei culturi de celule primare tumorale derivate din piesă recoltată de la pacient cu melanom MDNA, metodă care nu este utilizată în sistemele experimentale actuale ce vizează caracterizarea complexă *in vitro* a MDNA;
- Metoda de izolare oferă simultan un model unic de testare a unor compuși cu potențial terapeutic anti-tumoral și/sau de identificare a unor markeri asociați procesului tumoral;
- Modelul celular cu culturi primare stabilit prin această metodă evită recoltarea în mod repetat de material biologic de la pacient, tehnică invazivă și ne-recomandată în melanom;
- Modelul celular prezentat poate fi utilizat pentru stabilirea co-culturilor celulare cu populații de celule imune pentru testarea compușilor utilizați în imunoterapia melanomului.

Detalii privind realizarea prezentei invenții sunt prezentate în exemplele următoare:



**Exemplul 1****Caracteristici clinice pacient**

Pacient în vârstă de 44 ani se prezintă cu o formațiune tumorală pe braț drept în Departamentul Chirurgie Plastică a Spitalului Colentina. Se realizează rezecția totală a tumorii cu margini de siguranță de 1,1 cm de cea mai apropiată margine de rezecție. Tumora cu dimensiuni de 1,3/1,2/0,2 cm este supusă examenului histopatologic, imunohistochimic pentru diagnostic și realizarea culturilor primare celulare pentru stabilirea clonelor proliferative. Pacientul a semnat acordul informat privind utilizarea tumorii excizate în scop de cercetare în cadrul proiectului PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-341/2018 (acronim PATHDERM).

**Exemplul 2****Analiza histopatologică a tumorii rezecate**

Piesa de rezecție chirurgicală a fost trimisă în laboratorul de anatomie patologică imediat după excizie (cca 10 minute). Piesa a fost orientată, dimensionată și marcată cu tuș conform reperelor indicate de chirurg. A fost recoltat un mic fragment tisular tumoral de 5/3/3 mm care a fost introdus în ser fiziologic steril pentru efectuarea culturilor celulare. Ulterior, piesa a fost orientată macroscopic după protocolul specialității și au fost selecționate fragmente conținând ariile de interes. Fragmentele tisulare recoltate au fost imersate în formol 10% tamponat imediat după recoltare. Prelucrarea histopatologică s-a efectuat prin deshidratare, clarificare și impregnare cu parafină prin procedură automată (histoprocessor Leica ASP 200s), spălare piese 1½ h apă curentă, apoi introducere în aparat, urmată de următoarea rețetă prezentată în tabelul următor:

| Nr. etapa | Reactiv               | Timp procesare | temp | Presiune/ Vacuum | Timp scurgere |
|-----------|-----------------------|----------------|------|------------------|---------------|
| 1.        | Apa                   | 10 minute      | -    | P/V              | 80 sec.       |
| 2.        | Alcool etilic 70°     | 1½ h           | 40°C | P/V              | 80 sec.       |
| 3.        | Alcool etilic 80°     | 1¾ h           | 40°C | P/V              | 80 sec.       |
| 4.        | Alcool etilic 96°     | 1¾ h           | 40°C | P/V              | 80 sec.       |
| 5.        | Alcool etilic absolut | 1 h            | 40°C | P                | 80 sec.       |
| 6.        | Alcool etilic absolut | 1½ h           | 40°C | P/V              | 80 sec.       |
| 7.        | Alcool etilic absolut | 1½ h           | 40°C | P/V              | 80 sec.       |
| 8.        | Xilen                 | 2 h            | 52°C | P                | 80 sec.       |
| 9.        | Xilen                 | 2 h            | 52°C | P                | 80 sec.       |
| 10.       | Xilen                 | 2 h            | 55°C | P/V              | 80 sec.       |

*Lelei*



|     |          |     |      |   |         |
|-----|----------|-----|------|---|---------|
| 11. | Parafină | 1 h | 58°C | P | 80 sec. |
| 12. | Parafină | 2 h | 58°C | P | 80 sec. |
| 13. | Parafină | 3 h | 58°C | P | 80 sec. |

- Fragmentele impregnate cu parafină au fost incluse în blocuri de parafină cu ajutorul unor stații de includere Thermo Fisher Microm EC 1150 H și secționate la 3μ cu ajutorul microtomului rotativ Leica RM 2265; secțiunile au fost etalate pe lame simple pentru colorații de rutină (Hematoxină Eozină - HE) sau speciale (PAS, Giemsa, Perls, Fontana-Masson, Gomori) sau acoperite cu polilizină pentru colorațiile imunhistochimice (IHC). Colorația HE a fost efectuată cu ajutorul coloratorului automat Microm HMS 760; lamelele au fost montate cu ajutorul montatorului automat Leica CV 5030.

Protocolul de lucru pentru colorația hematoxină-eozină a cuprins următoarele etape:

- Deparafinare
- Hidratare alcool etilic absolut, 96°, 70°
- Spălare în apă
- Colorare cu hematoxină (hemalaun) Mayer – 30sec. - 5 minute\*
- Spălare în apă
- Diferențiere rapidă în alcool- acid clorhidric
- Spălare în apă
- Contrastare în apă litinată – 10 min
- Colorare cu eozină 10-90 secunde\*
- Deshidratare
- Clarificare
- Montare.

Reactivii necesari acestei etape:

- Hematoxilina (hemalaun) Mayer: hematoxilina 1,5 g + alaun de potasiu 75g + iodat de sodiu 0,3g + apa distilata 1 litru.
- Eozina: eozina galbena 6g + eozina albastra 6g + orange G 0.4g + alcool etilic 70° 700 ml + solutia saturata carbonat de litiu 80 ml + acid acetic glacial 3 ml.
- Alcool- acid clorhidric: 99 ml alcool etilic 70°+ 1 ml acid clorhidric 1N
- Apă litinată : 99 ml apă de robinet + 1 ml sol. saturată de carbonat de litiu

Diagnosticul histopatologic relevă existența unui melanom rar, melanom dezvoltat pe nev albastru. Se evidențiază o proliferare tumorală dispusă sub formă de celule eozinofile, cuiburi și

plaje cu moderat infiltrat limfoplasmocitar intratumoral focal. Celulele tumorale sunt epitelioid, de talie medie-mare, cu unul sau mai mulți nuclei hipercromi sau veziculoși, cu nucleoli proeminenți, eozinofili. Citoplasme tumorale abundente palid eozinofile sau pe alocuri clare, cu depozite focale de pigment brun (melanină) fin sau grosolan granular; marcat pleomorfism citonuclear. Din punct de vedere al markerilor specifici se observa celulele tumorale intens difuz pozitive pentru HMB45, intens difuz pozitive pentru T311, intens difuz pozitive pentru p16 și se constată relativ frecvente celule tumorale pozitive pentru p21. Celulele tumorale sunt intens difuz pozitive pentru S100, unele celule tumorale sunt pozitive pentru Ki67 cu un index ki67 5%. În Figura 1 și Figura 2 sunt exemplificate caracteristicile enumerate.

### Exemplul 3

#### Stabilirea culturii celulare primare din tumora rezecată

În acest exemplu este descris procedeul de obținere a clonelor celulare primare rezultate în urma prelucrării fragmentului tumoral recoltat în mediu de cultură suplimentat cu antibiotic-antimicotic.

Au fost utilizați următorii reactivi: mediu de cultura RPMI1640 (Sigma-Aldrich); ser fetal bovin; soluție antibiotic-antimicotic (100X, Sigma Aldrich); soluție tripsină - EDTA (0.25% cu roșu fenol, Sigma Aldrich); tampon fosfat salin (1X, steril, Sigma-Aldrich); mediu de crioprezervare celule cu DMSO (1X, Sigma Aldrich); colorant vital Tripan Blue (soluție sterilă 0.4%, Sigma-Aldrich).

Protocolul de lucru:

Metodologia descrisă de realizare culturi celulare primare este brevetată de grupul de inventatori [8]. Fragmentul tumoral de dimensiuni 5/3/3 mm a fost recoltat în soluție de antibiotic/antimicotic menținut peste noapte la 4°C.

- Tumora a fost prelucrată în condiții sterile având în vedere cultivarea pe termen lung intenționată; tumora a fost secționată în fragmente de 0,5 mm<sup>2</sup> și au fost introduse într-o soluție 0,25% tripsina în TFS, la 4°C, peste noapte.
- După 24h, fragmentele tumorale au fost trecute prin vată sterilă pentru îndepărtarea debriurilor tisulare și celulare. Suspensia celulară obținută a avut o viabilitate de peste 95%, viabilitate evaluată prin colorație cu colorant vital (*Trypan Blue*).
- Suspensia celulară a fost supusă cultivării în mediu RPMI1640 cu 10% FBS, 0.04% soluție de antibiotic/antimicotic, cu o concentrație finală de calciu de 0.04 mM. Celulele au fost cultivate în flacoane sterile de plastic cu suprafață de 25 cm<sup>2</sup> la o densitate de 10<sup>7</sup> celule/100-mm suprafață vas de cultură, la 37°C în atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>.

*lelei*



- După 48 de ore de la cultivarea primară, toate celulele neaderente care au fost considerate neviabile au fost îndepărtate din flacon și mediul de cultura a fost înlocuit cu mediu proaspăt. Acest tratament a fost repetat până toată cultura celulară a devenit aderentă și a început proliferarea celulară.
- După 7 zile de la inițierea culturii primare celulele au un aspect aderent viguros exemplificat în Figura 3.
- După 14 zile de la inițierea culturii celulare primare, pasajul celular a constat în tratarea celulelor cu o soluție de tripsină-EDTA pentru a fi desprinse de pe substrat și re-cultivate la densitatea inițială.
- După încă 14 zile cultura celulară a fost considerată omogenă și a fost analizată de anatomo-patolog pentru evaluarea caracteristicilor histomorfologice.
- Suspensia celulară omogenă a fost apoi repartizată în fiole sterile conținând  $5 \times 10^6$  celule/ml mediu standard de stocare cu dimetil sulf-oxid (DMSO), și au fost stocate în Banca de celule a Institutului "Victor Babeș", pentru verificarea periodică a stabilității în timp.

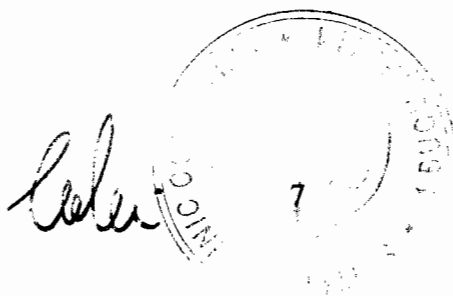
#### Exemplul 4

##### Caracterizarea culturi de celule primare de melanom

În acest exemplu este descrisă caracterizarea culturilor de celule primare **din melanom dezvoltat pe nev albastru**

Protocolul de lucru a constat în:

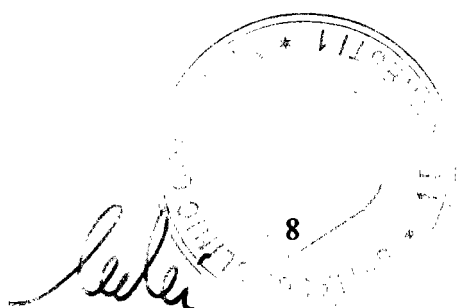
- Culturile celulare inițiate conform exemplului 3 au fost stocate timp de 6 luni la azot lichid ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) și au fost dezghețate în condiții standard, iar celulele au fost re-cultivate până la obținerea unei confluențe de 80% evaluată la microscopul ranversat, exemplificarea aspectului confluenței celulare este redat în Figura 4.
- Alicote din culturile celulare au fost cultivate pe lame de microscop timp de 48 de ore și investigate de anatomo-patolog pentru determinarea caracteristicilor histologice și morfologice.
- În urma analizei histopatologice se constată o cultură de celule tumorale cu moderat pleomorphism citonuclear: nuclei mari, cu cromatină hiperromă contur neregulat; anizocarie importantă; citoplasme eozinofile reduse cantitativ cu depunere ocazională de pigment negricios melanic. Aspectul este prezentat în Figura 5.



- Se constată existența fibroblastelor asociate tumorii de talie mai mică, unele alungite (Figura 5), iar celulele tumorale poligonale au pozitivitate citoplasmatică fin granulară pentru vimentină (Figura 6).
- Celule tumorale cultivate sunt negative pentru actina de mușchi neted; rare fibroblaste stromale, unele alungite, prezentând pozitivitate citoplasmatică pentru actina de mușchi neted. Celule tumorale cultivate au o pozitivitate variabilă pentru T311 (Figura 7).

În exemplul menționat este prezentată o metodă eficientă de stabilire a unei culturi de celule primare tumorale realizate dintr-o tumoră de melanom rar care își pastrează capacitatea tumorigenă. Utilizarea acestui model de celule tumorale este importantă pentru studiul markerilor tumorali genomici și proteomici, pentru îmbunătățirea diagnosticului în melanomul cutanat dezvoltat pe nev albastru.

În plus, acest model de celule tumorale este adecvat pentru testarea de compuși cu potențial antitumoral în domeniul dermato-oncologiei.



**DESCRIERE FIGURI**

**Figura 1.** Evaluarea histopatologică a tumorii rezecate - Melanom dezvoltat pe nev albastru.

A. proliferare tumorală dispusă sub formă de celule izolate, cuiburi și plaje cu moderat infiltrat limfoplasmocitar intratumoral focal. HE x 100. B-C. Celulele tumorale sunt epitelioid, de talie medie-mare, cu unul sau mai mulți nuclei hipercromi sau veziculoși, cu nucleoli proeminenți, eozinofili. Citoplasme tumorale abundente palid eozinofile sau pe alocuri clare, cu depozite focale de pigment brun (melanină) fin sau grosolan granular; marcat pleomorfism citonuclear. Mitoze prezente (index mitotic tumoral în hot spot 4 mitoze / mm<sup>2</sup>); HE x 400.

**Figura 2.**A. Celulele tumorale sunt intens difuz pozitive pentru HMB45. HMB45 x 400. B. Celulele tumorale sunt intens difuz pozitive pentru T311. T311 x 400. C. Celulele tumorale sunt intens difuz pozitive pentru p16. P16 x 400. D. Relativ frecvente celule tumorale pozitive pentru p21. P21 x 400. E-F. Celulele tumorale sunt intens difuz pozitive pentru S100 (roșu); unele celule tumorale sunt pozitive pentru Ki67 (nuclear, maro) – index ki67 5%. Imunomarcaj dual S100-Ki67 (S100 – roșu, ki67 – maro) X 400

**Figura 3.** Celule primare tumorale cultivate 7 zile în mediu RPMI1640 suplimentat cu 10% ser fetal bovin, antibiotic-antimicotic. Se remarcă existența a doua tipuri celulare: celule tumorale pigmentate și fibroblaste speciale asociate tumorii.

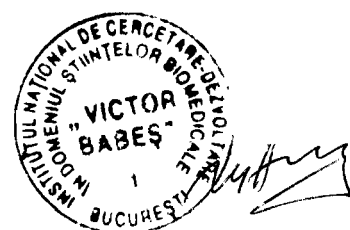
**Figura 4.** Celule primare tumorale cultivate 14 zile în mediu RPMI1640 suplimentat cu 10% ser fetal bovin, antibiotic-antimicotic, după stocare timp de 6 luni în azot lichid

**Figura 5.** Evaluarea histopatologică a culturii celulare primare. A-B. Celule tumorale cu moderat pleomorfism citonuclear: nuclei mari, cu cromatina hipercromă contur neregulat; anizocarie importantă; citoplasme eozinofile reduse cantitativ. HE x 400. C-D. Depunere ocazională de pigment negricios melanic. Fontana-Masson x 400

**Figura 6.** Evaluarea histopatologică a culturii celulare primare. A-D. Fibroblaste stromale, unele cu prelungiri citoplasmice. Vimentina x 400. E-F. Celule tumorale poligonale cu pozitivitate citoplasmică fin granulară pentru vimentina; fibroblaste stromale de talie mai mică, unele alungite. Vimentina x 400.

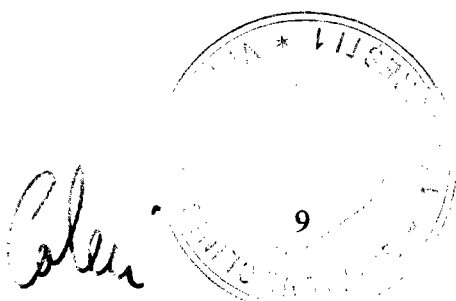
**Figura 7.** A-D. Celule tumorale negative pentru actina de mușchi neted; rare fibroblaste stromale, unele alungite, prezentând pozitivitate citoplasmică pentru actina de mușchi neted. SMA x 400; E-F. Celule tumorale cu pozitivitate variabilă pentru T311. T311 x 400

10



**REVENDICĂRI**

1. Metodă de izolare și stabilire de culturi celulare primare din *melanom dezvoltat pe nev albastru* MDNA de utilizat în studiul complex al acestui subtip tumoral cutanat rar, și care reprezintă o alternativă eficientă comparativ cu alte modele celulare bi- sau tridimensionale.
2. Utilizarea acestui model de celule primare de la revendicarea 1 pentru caracterizarea genomică și proteomică a MDNA în vederea îmbunătățirii diagnosticului în acest tip rar de melanom.
3. Utilizarea acestui model de celule primare de la revendicarea 1 pentru testarea *in vitro* a eficienței unor agenți cu potențial (imuno)terapeutic într-un context cât mai relevant din punct de vedere fiziologic.



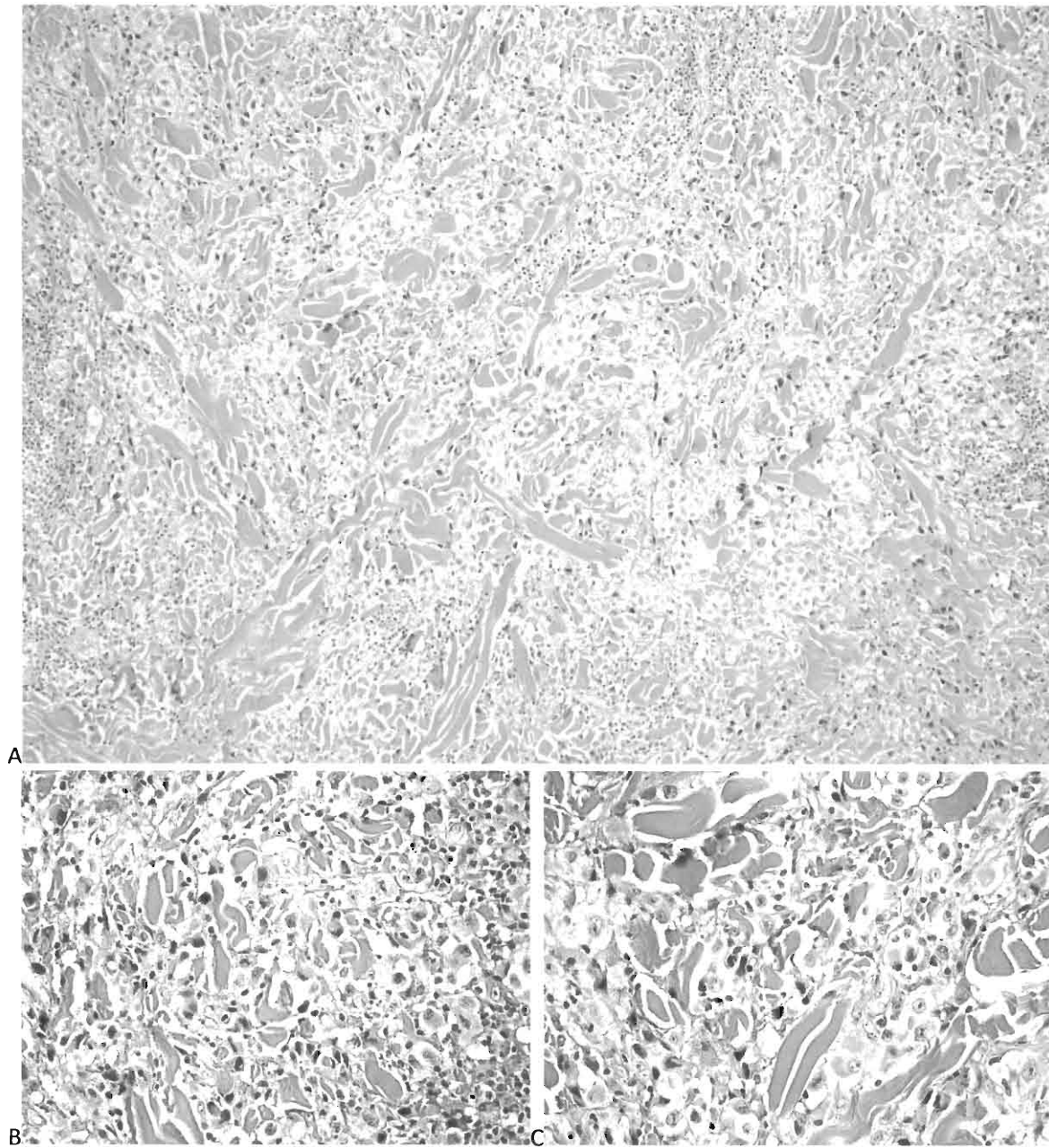


FIGURA 1

*lebei*



11



*[Signature]*

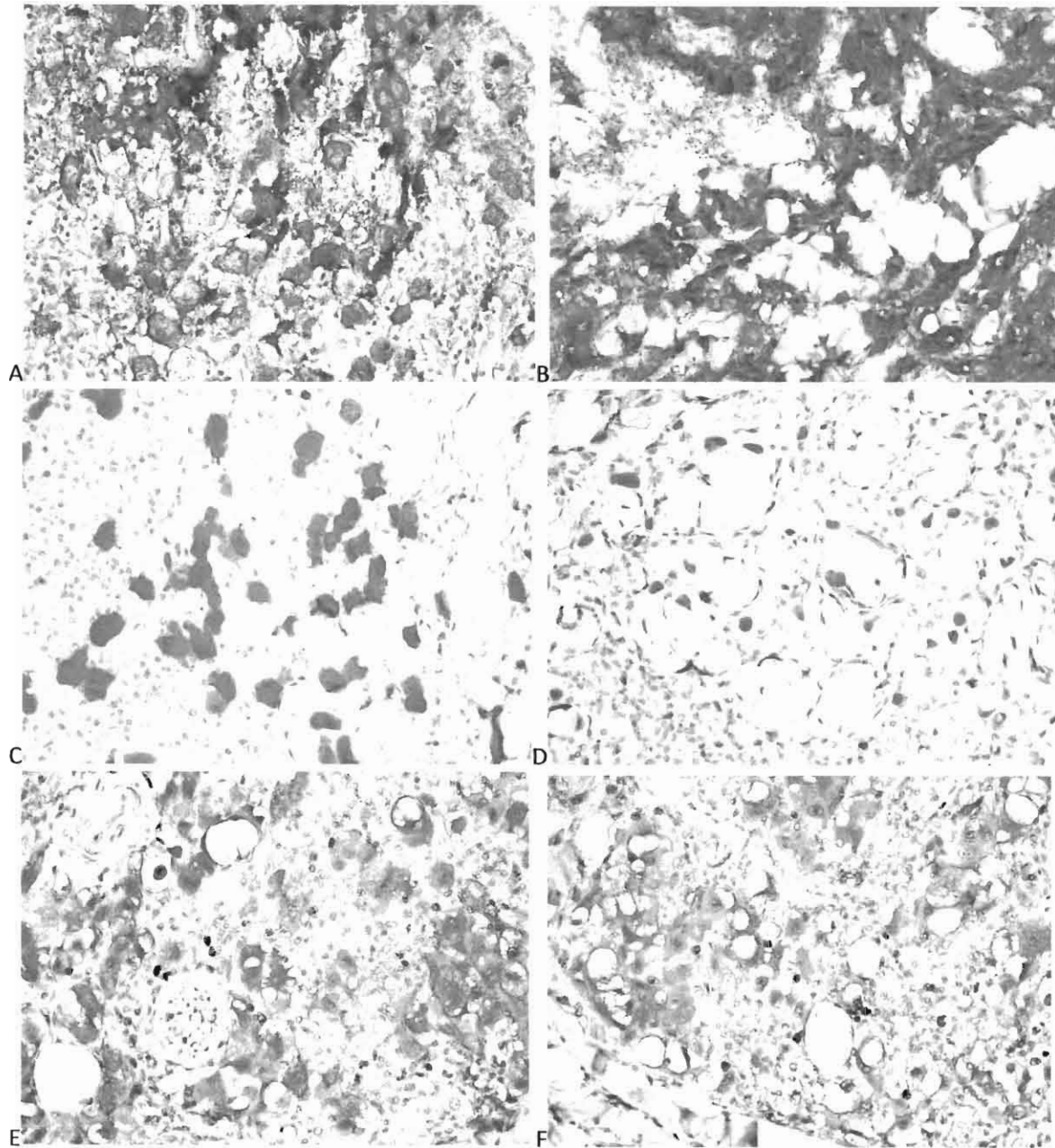


FIGURA 2



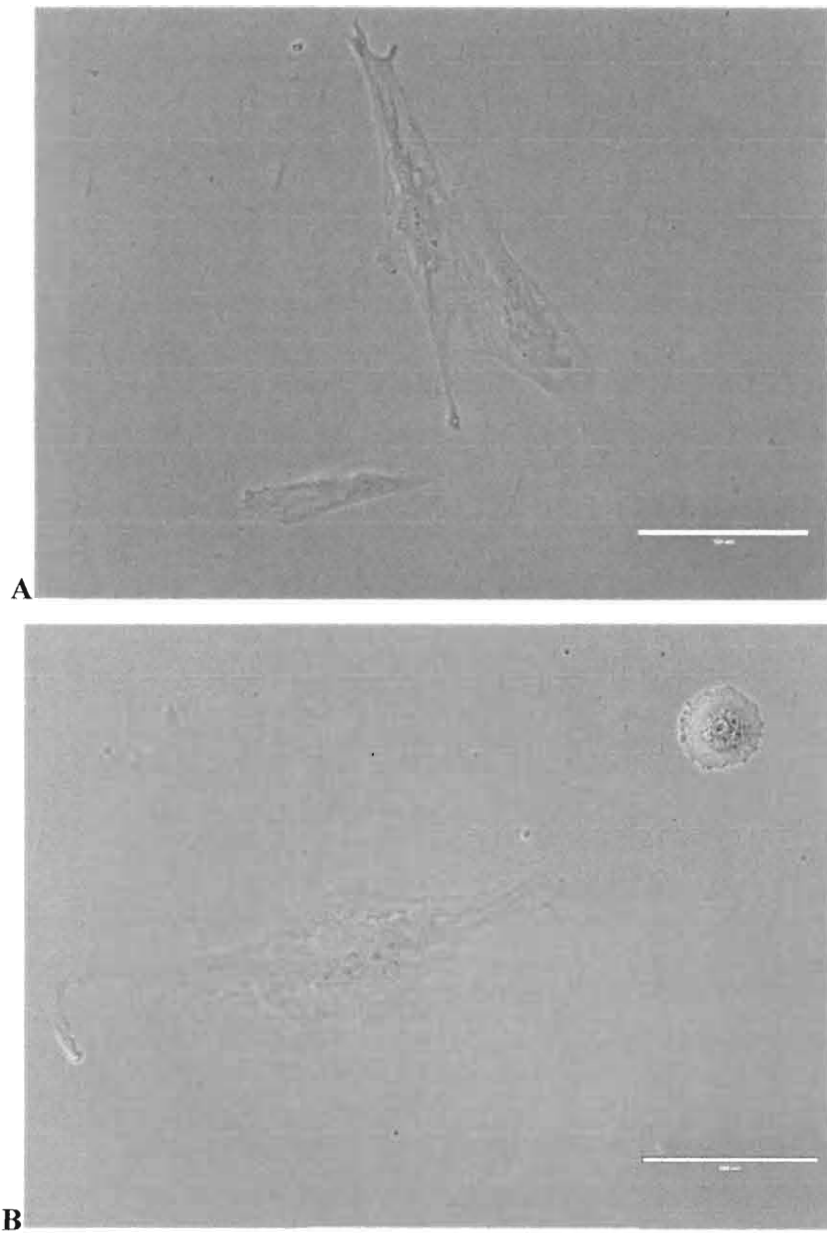


FIGURA 3

*Calciu*

COLENTINA \* 11830000

13





FIGURA 4

*Coloni*



14



*[Signature]*

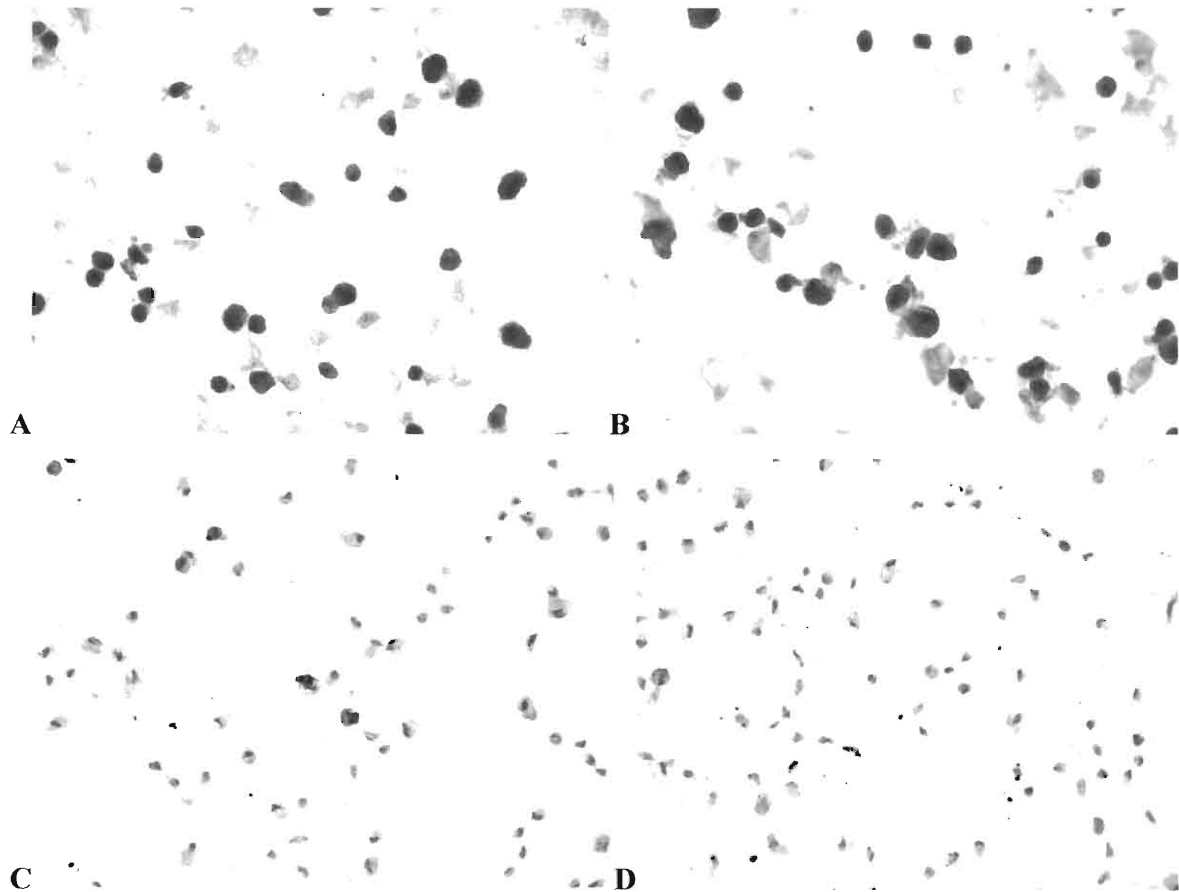


FIGURA 5



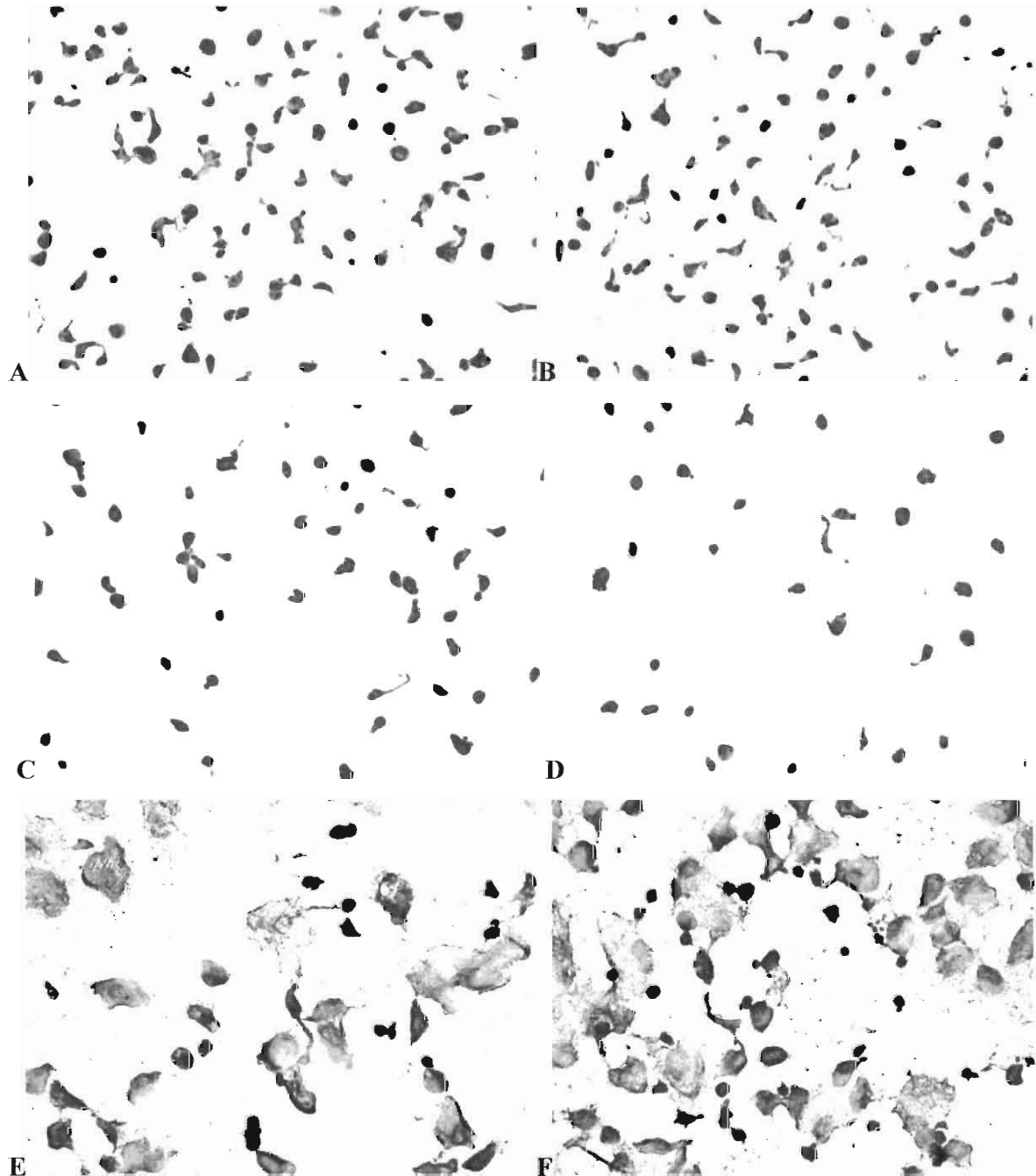


FIGURA 6

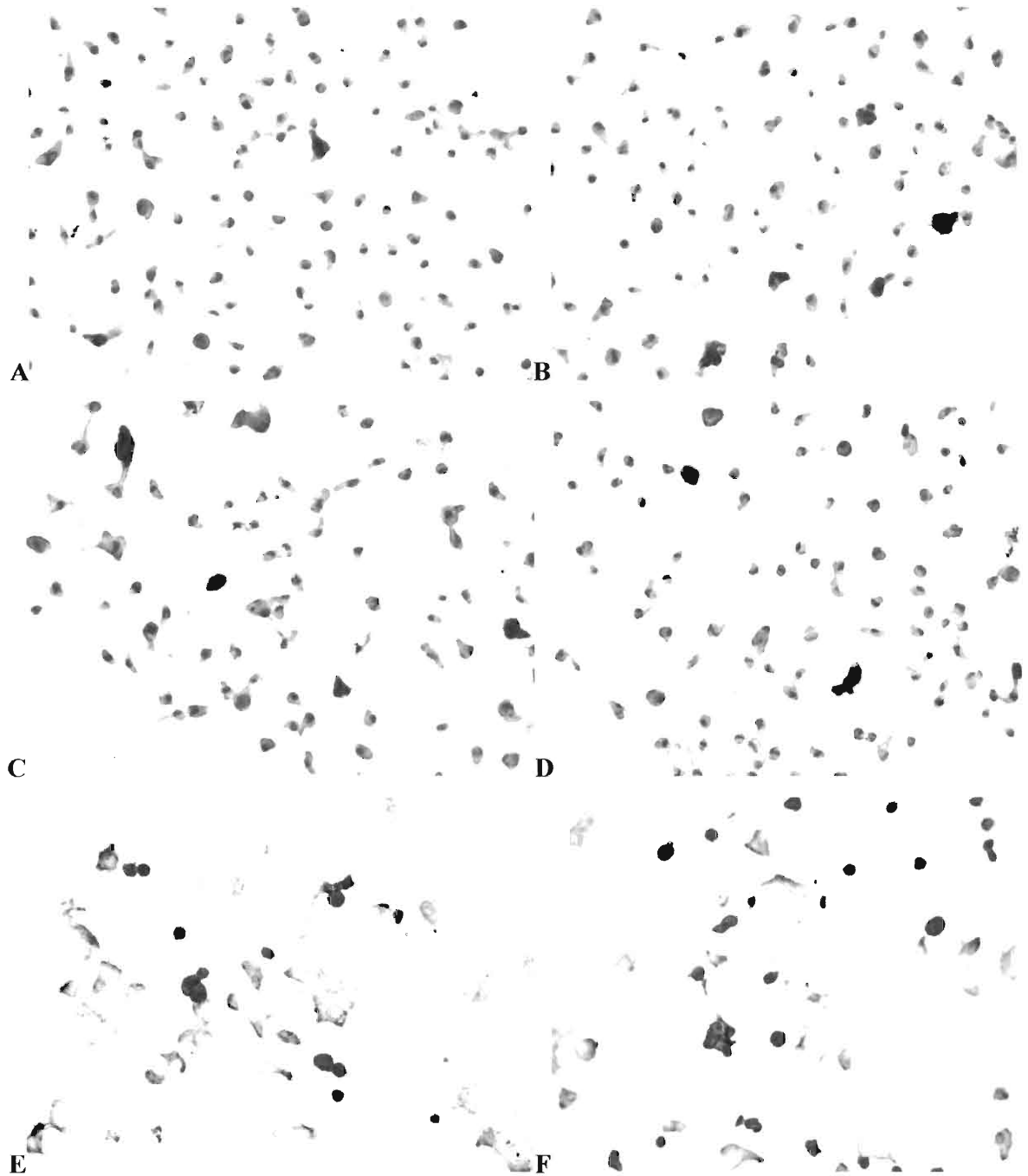


FIGURA 7

