

**EXPRESSÃO DE CICLINA D1, CDK4, p16<sup>ink4</sup>, p21<sup>WAF1</sup>,  
INTEGRINA  $\alpha$ V $\beta$ 3, MMP-2 E MMP-9 EM MELANOMA  
CUTÂNEO PRIMÁRIO DE PACIENTES SUBMETIDOS À  
PESQUISA DE LINFONODO SENTINELA**

**CRISTIANO LUIZ HORTA DE LIMA JUNIOR**

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para obtenção do título de Mestre em  
Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr Gilles Landman**

**São Paulo**

**2006**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa  
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Lima Junior, Cristiano Luiz Horta de

**Expressão de ciclina D1, CDK4, p16<sup>ink4</sup>, p21<sup>WAF1</sup>, integrina  $\alpha$ V $\beta$ 3, MMP-2 e MMP-9 em melanoma cutâneo primário de pacientes submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela** / Cristiano Luiz Horta de Lima Junior – São Paulo, 2006.

101p.

Dissertação (mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Gilles Landman

Descritores: 1. MELANOMA. 2. BIÓPSIA DE LINFONODO SENTINELA. 3. IMUNOHISTOQUÍMICA. 4. CICLINA D1. 5. PROTEINAS CDK. 6. PROTEINA p16. 7. PROTÍNA P21. 8. METALOPROTEINASES. 9. INTEGRINAS. 10. TISSUE MICRO ARRAY

*Pode o homem tornar-se culto pela cultura dos outros,  
mas só se torna sábio por suas próprias experiências.*

*Mansour Chalita*

## DEDICATÓRIA

*A todos que aceitaram, mesmo sem compreender, a minha ausência e me ajudaram de várias formas a finalizar este trabalho.*

*Aos pacientes que sublimam a dor na esperança de poder, um dia, ajudar o próximo.*

## AGRADECIMENTOS

Ao amigo Prof. Dr. Gilles Landman que mesmo sem me conhecer ensinou-me o caminho da ética profissional e, hoje, guia-me, sem medir esforços, nas atividades acadêmicas contagiando-me com seu espírito científico e sua infinita paciência. Obrigado pelos sábios ensinamentos, não só os acadêmicos, mas também àqueles que só um grande amigo pode dar nos momentos mais inesperados da vida.

À minha querida Mestra Prof. Dra. Helena Muller que com sua incansável disposição e invejável energia vital ensina-me muito mais do que eu mereça como aprendiz. Colocou-me na “vida dermatológica” e, como uma mãe, incentiva-me a continuar em frente mesmo que o terreno não pareça propício, postando-se por perto para me acolher com carinho sempre que preciso. Que Deus te conserve assim por muitos e muitos anos para que continuemos desfrutando de seu bom humor e sabedoria. Saudações corintianas.

À minha amada, amante e esposa Flávia Silva Horta de Lima pelo seu Amor Incondicional e seu companheirismo que mesmo nas empreitadas mais difíceis incentiva-me com suas palavras doces e sábias. Dotada de uma paciência “Dalailâmica” equilibra-me para que eu prossiga sem perder o foco da realidade. Namastê.

Ao meu filho Vitor Horta de Lima e Silva pelas noites em claro, pelas preocupações próprias dos pais e, por me desviar sempre que possível dos estudos fazendo-me lembrar que não existe nada mais importante do que a vida. Com a graça peculiar dos recém-natos renovava-me as energias enchendo-me de inspiração para prosseguir acreditando que um dia isso possa lhe servir de exemplo e orgulho.

À minha mãe Rosa Aguiar Horta de Lima e ao meu pai Christiano Luiz Horta de Lima por tudo que fazem por seus filhos inclusive dispensar horas ouvindo reclamações e desculpas a respeito de assuntos que desconhecem, mas fingem

conhecer para me ajudar sempre que preciso. Dotados da força e da sabedoria servem de exemplo de vida. Obrigado de coração.

Aos meus irmãos que desde a infância aprenderam a dividir e compartilhar tudo. Obrigado pela paciência e compreensão principalmente nos meus momentos de mau-humor.

Á minha sogra Darlene Luzia Pereira Silva e ao meu sogro Onildo Alves da Silva que me aceitaram como filho e, como pais, torcem para que tudo dê certo. Meus queridos, muito obrigado por tudo.

Aos amigos Bianca Costa Soares de Sá e Eduard Rene Brechtbuhl pela colaboração, incentivo e apoio durante todo o tempo desta empreitada, não importando a hora ou dia da semana.

Aos colegas do Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital do Câncer de São Paulo que me incentivaram durante toda esta jornada.

*Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, chefe do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A C Camargo, pela oportunidade de utilizar de forma irrestrita todos os recursos disponíveis em seu departamento.*

Ao Dr. Luiz Fernando Lima Reis, diretor da Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente, por ter me mostrado que os atos podem ensinar mais do que palavras e não são encontrados nos livros. Obrigado por acreditar na realização deste projeto.

Às Sra. Ana Maria Rodrigues, Sra. Márcia Miwa Hiratani e Sra. Luciana Costa Pitombeira, por toda ajuda, incentivo e apoio que foram indispensáveis durante todo o tempo deste projeto de pós graduação.

Ao corpo docente da Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente pela excelente qualidade de ensino e por me mostrar que ainda tenho muito que aprender.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Karina de Cássia Braga Ribeiro, pela amizade desde os tempos da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e pelos valiosos ensinamentos estatísticos.

A Sra. Hirde Contesini e a toda sua equipe do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital do Câncer de São Paulo pela eficiência e prontidão que me atenderam sempre com paciência e boa vontade.

À *Suely Francisco*, Bibliotecária, e toda sua equipe: Rosinéia Aguiar Carneiro, Janaina Beltrame dos Santos, Francyne Pólen Gomes de Lima, pela incansável paciência e admirável capacidade de repetir os caminhos da procura de artigos científicos de forma sempre carinhosa. Obrigado pela revisão e diagramação deste trabalho.

A todos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de São Paulo em especial a Srta. Eliana dos Santos e Srta. Andreza M S Rocha, por terem me auxiliado e me acolhido sem restrições.

Aos funcionários do arquivo de blocos Sr. Glauber de Jesus e Sr. Marcelo Augusto Sibacks por todo trabalho realizado neste projeto.

Ao Sr. Carlos Eugênio Nascimento Braga, funcionário do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de São Paulo, pelo excelente trabalho na confecção do *tissue microarray*.

Ao biólogo José Ivanildo Neves e Simone Cristiane Pagoti por ter realizado todas as reações imuno-histoquímicas, sempre com gentileza e boa vontade.

Aos queridos Dr. Roger Chammas e Dra Mariângela Esther Alencar Marques, pelas críticas e sugestões que auxiliaram na execução deste projeto.

Ao amigo e calouro, hoje Prof. Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani, pelos ensinamentos, dicas e análise estatística deste trabalho.

À Fundação Antônio Prudente, por permitir o meu aprimoramento profissional e acadêmico.

A todos os pacientes que contribuíram com este estudo, os meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

Lima Junior CLH. **Modulação Expressão de Ciclina D1, CDK4, p16<sup>ink4</sup>, p21<sup>WAF1</sup>, integrina  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ , MMP-2 e MMP-9 em melanoma cutâneo primário de pacientes submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela.** São Paulo; 2006. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

**Introdução:** O estudo de proteínas envolvidas na adesão e ciclo celular de células de melanoma é importante para compreendermos o comportamento biológico e a capacidade em produzir metástases destes tumores que mantém sua incidência crescente em todo mundo. A pesquisa sistemática do primeiro linfonodo de drenagem (sentinela) representa o status linfonodal loco regional e sua positividade é indicativa de doença metastática, fazendo parte do sistema de estadiamento clínico do melanoma atual. O Hospital do Câncer A. C. Camargo de São Paulo realiza pesquisa de linfonodo sentinela em melanoma cutâneo desde 1997 sendo considerado referência no estadiamento e tratamento destes tumores. Procurar as razões que levariam melanomas com fatores histopatológicos semelhantes a desenvolverem metástases seria muito importante.

**Objetivo** Estudar a expressão das proteínas controladoras do ciclo celular (Ciclina D1, CDK4, p16<sup>ink4</sup>, p21<sup>WAF1</sup>), da adesão celular (integrina  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ ) e enzimas proteolíticas através da ativação da metaloproteinase-2 (MMP-02) e metaloproteinase-9 (MMP-09) em lesões cutâneas de melanomas que evoluíram com e sem metástases em linfonodo sentinela, por estudo imunoistoquímico. **Pacientes e métodos:** estudo retrospectivo de 84 pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo primário realizado no Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A C Camargo, submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela, no período de 1998 a 2002. O estudo imunoistoquímico para os marcadores acima mencionados, foi realizado em lâminas convencionais para os casos de melanomas com espessura de Breslow menor que 1mm (17 casos) e em lâminas de *Tissue micro array* (TMA) para os demais casos de melanoma. O bloco de TMA foi confeccionado com cilindros de 1mm de diâmetro de 134 amostras de tumores que correspondem a melanomas de 67 pacientes representados em duplicata. Foram incluídas amostras de 12 nevos melanocíticos intradérmicos que serviram de controle das reações. **Resultados:** A idade média ao diagnóstico foi de 53

anos com predomínio de mulheres (53%). A pesquisa de metástases em linfonodo sentinela resultou negativa em sessenta e quatro casos (76%), sendo, portanto, positiva em vinte casos (24%). Das variáveis histopatológicas, a espessura do tumor (Breslow –  $p=0,001$ ), o nível de Clark ( $p=0,010$ ) e a invasão perineural ( $p=0,011$ ) mostraram associação estatisticamente significativa com as micrometástases no linfonodo sentinela. Das variáveis moleculares somente a ausência de expressão de ciclina D1 apresentou associação estatisticamente significativa com as micrometástases no linfonodo sentinela ( $p=0,001$ ). As demais variáveis não apresentaram associação estatisticamente significativa com metástases no linfonodo sentinela. Após a avaliação logística múltipla, a espessura do tumor (Breslow – OR=0,011; IC95%:1,7-63,7), invasão neural (OR=0,013; IC95%:1,9-318,9) e negatividade para ciclina D1 (OR=0,010; IC95%: 1,5-22,8) mostraram-se associadas à presença de metástase no linfonodo sentinela de modo estatisticamente significativo. **Conclusões:** A espessura do tumor (Breslow) continua sendo o fator prognóstico de maior impacto no desenvolvimento de metástases em linfonodo sentinela. A variável histológica invasão perineural, embora presente em um número reduzido de casos, apresentou-se estatisticamente significativa quando correlacionada à metástase em linfonodo sentinela. É provável que a ausência de ciclina D1 possa ser considerada como fator prognóstico para o desenvolvimento de metástases nodais de melanoma cutâneo, pois se verificou correlação entre a ausência de expressão de ciclina D1 e presença de metástase em linfonodo sentinela tanto na análise univariada quanto na análise multivariada. A expressão de CDK4 parece não ter importância como fator preditivo de metástases nodais de melanoma cutâneo. A expressão da proteína p16 não demonstrou correlação com a profundidade da infiltração dérmica, bem como com o desenvolvimento de metástase em linfonodo. Observaram-se correlação positiva entre a expressão de  $\alpha\beta3$  e MMP-2. Porém ambas as proteínas não mostraram correlação estatisticamente significativa com desenvolvimento de metástases linfonodais. Todos os nevos melanocíticos estudados (intradérmicos) expressaram positividade para proteína p16, sendo negativa a expressão de p21 em todos eles. Esta observação sugere que nestas lesões melanocíticas benignas o controle do ciclo celular é realizado pela via p16/pRb. O presente estudo, através da análise de cortes histológicos convencionais e de TMA, analisou os parâmetros histopatológicos e expressão de proteínas por estudo imunoistoquímico correlacionando-os com sucesso.

## SUMMARY

Lima Junior CLH. **Expression of Cyclin D1, CDK4, p16<sup>ink4</sup>, p21<sup>WAF1</sup>,  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin, MMP-2 and MMP-9 in primary cutaneous melanoma of patients with sentinel lymph node examination.** São Paulo; 2006. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

**Introduction:** Melanoma incidence is increasing worldwide. The mechanisms that regulate the biological behavior and metastatic capacity of melanoma are not completely understood. Cell cycle proteins and adhesion molecules have been pointed as participants in this process, but few studies have compared patients with and without micrometastatic disease from melanoma in sentinel lymphnodes (SLN). It has been established that SLN is one of the most accurate methods for prognosis of melanoma and other diseases, such as breast cancer, and is a worse outcome predictor. However, very few studies have compared the expression of cell cycle proteins to establish a link with micrometastatic melanoma. **Objective:** to study the expression of cell cycle proteins (Cyclin D1, CDK4, p16<sup>ink4</sup>, p21<sup>WAF1</sup>), cell adhesion protein ( $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin) and proteolytic enzymes through activation of metalloproteinase-2 (MMP-02) e metalloproteinase-9 (MMP-09) in specimens of primary cutaneous lesions of melanoma that did and did not metastasize to SLN, using immunohistochemistry. **Patients e methods:** this is a retrospective study of 84 patients diagnosed as primary cutaneous melanoma in the Department of Anatomic Pathology of the Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A C Camargo, in which SLN had been evaluated between 1998 and 2002. A standard immunohistochemistry staining was performed for the markers mentioned above and in conventional glass-slide sections, for thick melanomas (17 specimens) and in *tissue micro array* (TMA) glass slides, for the remaining specimens. The TMA paraffin block was built with 134 samples of melanoma with cores of 1 mm in diameter. This corresponded to 67 patient melanomas in duplicate. Twelve melanocytic nevi were included as a control. **Results:** A mean age of 53 years with a slight women predominance (53%) was found. No metastatic disease was found in 64 (76%) cases whereas in 20 (24%) cases a positive result was obtained. Histopathological variables, Breslow's tumor thickness (p=0,011), Clark's level (p=0,010) and perineural invasion

( $p=0,011$ ) were statistically associated to SLN micrometastases. The only molecular variable with statistical significance to correlate with SLN micrometastases was the absence of cyclin D1 expression ( $p=0,001$ ). All other variables had no relationship with SLN micrometastases. When logistic multiple regression was applied Breslow's thickness (OR=0,011; IC95%:1,7-63,7), perineural invasion (OR=0,013; IC95%:1,9-318,9) and negativity for cyclin D1 (OR=0,010; IC95%: 1,5-22,8) had a significant association with metastatic disease in the SLN. **Conclusions:** Breslow's thickness of melanoma, is still the major prognostic factor to predict metastatic behaviour in SLN. Perineural invasion, although present in a reduced number of cases, had statistical significance as a histological variable to predict SLN metastases. It is likely that the absence of cyclin D1 is a prognostic factor for the development of SLN metastases because both univariate and multivariate analysis pointed out a relationship between cyclin D1 absence and SLN metastases. Expression of CDK4 does not seem to be important as a predictor for nodal metastatic disease. No relationship between the expression of p16 and depth of the tumor, as well as nodal metastases was found. A correlation between  $\alpha\beta3$  integrin expression and MMP-2 has been found. However, none of these proteins had correlated with the development of nodal metastases. All intradermal melanocytic nevi expressed p16, whereas p21 was negative. This observation may suggest that in these benign melanocytic lesions, cell cycle control is obtained through the p16/pRb pathway. In this study, conventional sections and TMA's allowed a successful correlation between histopathological variables and immunohistochemical expression of proteins.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema dos preparados histológicos de cada bloco de parafina do linfonodo sentinela realizado no Hospital do Câncer AC Camargo – São Paulo.	5
<b>Figura 2</b>	Visualização ao microscópio óptico de células tumorais pela técnica de imunistoquímica contra corada pelos métodos de Giemsa e H&E para marcação nuclear (p16).	28
<b>Figura 3</b>	Visualização ao microscópio óptico de células tumorais pela técnica de imunistoquímica contra corada pelos métodos de Giemsa e H&E para marcação nuclear e citoplasmática.	30
<b>Figura 4</b>	Estudo imunistoquímico para ciclina D1 nas células de melanoma cutâneo.	39
<b>Figura 5</b>	Estudo imunistoquímico para cdk 4 nas células de melanoma cutâneo com expressão negativa.	41
<b>Figura 6</b>	Estudo imunistoquímico para cdk 4 nas células de melanoma cutâneo com expressão positiva.	42
<b>Figura 7</b>	Estudo imunistoquímico para p16 nas células de melanoma cutâneo com expressão negativa.	44
<b>Figura 8</b>	Estudo imunistoquímico para p16 nas células de melanoma cutâneo com expressão positiva.	45
<b>Figura 9</b>	Estudo imunistoquímico para p16 nas células de melanoma cutâneo com expressão negativa.	47
<b>Figura 10</b>	Estudo imunistoquímico para p21 nas células de melanoma cutâneo com expressão positiva.	48
<b>Figura 11</b>	Estudo imunistoquímico para MMP-2 nas células de melanoma cutâneo com expressão variada.	50
<b>Figura 12</b>	Estudo imunistoquímico para MMP-9 nas células de melanoma cutâneo com expressão variada.	52
<b>Figura 13</b>	Estudo imunistoquímico para ciclina D1 nas células de melanoma cutâneo.	54
<b>Figura 14</b>	Estudo imunistoquímico para p16 e p21 nas células névicas.	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo as variáveis demográficas e clínicas. (Hospital do Câncer AC Camargo. 1998-2004).	35
<b>Tabela 2</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo o estadiamento clínico definido pelo AJCC - 2002. (Hospital do Câncer AC Camargo. 1998-2004).	35
<b>Tabela 3</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo o estadiamento patológico definido pelo AJCC - 2002. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	36
<b>Tabela 4</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo as variáveis histopatológicas estudadas. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	37
<b>Tabela 5</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de ciclina D1. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	38
<b>Tabela 6</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de CDK4. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	40
<b>Tabela 7</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de p16. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	43
<b>Tabela 8</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de p21. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	46

<b>Tabela 9</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de MMP-2. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	49
<b>Tabela 10</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de MMP-9. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	51
<b>Tabela 11</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de $\alpha\beta3$ . (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	53
<b>Tabela 12</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo o status para micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e as variáveis demográficas e clínicas estudadas. (Hospital do Câncer AC Camargo - 1998-2004).	56
<b>Tabela 13</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e as variáveis histopatológicas estudadas. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	57
<b>Tabela 14</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de ciclina D1. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	58
<b>Tabela 15</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de CDK4. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	58

<b>Tabela 16</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de p16. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	58
<b>Tabela 17</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de p21. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	59
<b>Tabela 18</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de MMP-2. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	59
<b>Tabela 19</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de MMP-9. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	60
<b>Tabela 20</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de $\alpha v\beta 3$ . (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).	60
<b>Tabela 21</b>	Modelo final para regressão logística múltipla das variáveis selecionadas na análise univariada associadas à metástase no linfonodo sentinela.	61
<b>Tabela 22</b>	Descrição das etapas da regressão logística múltipla para a identificação das variáveis associadas às metástases nos linfonodos pélvicos.	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico (do inglês deoxyribonucleic acid)
<b>CDK</b>	Quinase dependente de Ciclina (do inglês <i>Cyclin-dependent Kinase</i> )
<b>pRb</b>	Proteína do retinoblastoma
<b>CAK</b>	Quinase ativadora de CDK ( do inglês CDK-activating kinase)
<b>MAPK</b>	do ingles <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MMP</b>	metaloproteinase
<b>TIMP</b>	inibidores teciduais de metaloproteinases
<b>TMA</b>	<i>tissue microarray</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico (do inglês ribonucleic acid)
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>SAME</b>	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
<b>LNS</b>	Linfonodo sentinela

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	O Linfonodo Sentinela	2
1.2	Desenvolvimento do Câncer – Melanoma	6
1.3	O Ciclo Celular	7
1.4	As Metaloproteinases	10
1.5	As Integrinas	12
1.6	O Tissue Array	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específico	15
2.3	Objetivos Secundários	15
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
3.1	Comitê de Ética em Pesquisa	16
3.2	Descrição do Estudo	16
3.3	Revisão dos Prontuários	17
3.4	Critérios de Inclusão	17
3.5	Método	17
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
4.1	Descrição da População Estudada	32
4.2	Descrição das Características Sócio-Demográficas e Clínicas	33
4.3	Descrição das Características Histopatológicas	34
4.4	Expressão Protéica por Imunoistoquímica	38
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>91</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é uma neoplasia que mantém sua incidência crescente em todo o mundo, sendo a de maior aumento anual nas populações de pele clara (MACKIE et al. 2002; GERBAUD et al. 2003; KATALINIC et al. 2003; DE VRIES et al. 2003; ARMSTRONG 2004). Apresenta a capacidade de acometer indivíduos jovens, caracterizando-se pela evolução refratária às terapêuticas atuais quando ocorrem metástases (SLOMINSKI et al. 1998; SHEN et al. 2003).

Corresponde à segunda neoplasia maligna encontrada em Queensland, Austrália (Queensland Cancer Registry-QCR 1997) No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) revelam uma incidência global que varia de 3,86 a 4,4 por 100.000 habitantes para o sexo masculino e feminino respectivamente (Ministério da Saúde 2005). Para o ano de 2006, estão previstos 2.710 casos novos em homens e 3.050 casos novos em mulheres. A cidade de Florianópolis (SC) apresenta a maior incidência de melanoma cutâneo dentre as capitais do Brasil: 7,2 e 10,3 casos novos por 100.000 habitantes para o sexo masculino e feminino respectivamente (Ministério da Saúde 2005).

Os melanócitos são células encontradas ao longo da camada basal da epiderme cuja principal função é a produção do pigmento melanina que confere o tom castanho à pele conferindo fotoproteção natural (GREEN e KHAVARI 2004; RIZOS et al. 2004). Também atuam como células sensoriais e regulatórias através da indução de respostas neuroendócrinas e imunomodulatórias, participando, deste modo, da manutenção da homeostase cutânea (SLOMINSKI et al. 1998). Os

melanócitos, em indivíduos adultos, estão normalmente quiescentes e podem apresentar atividade mitótica discreta frente a estímulos externos específicos como radiação ultravioleta e cicatrização (SLOMINSKI et al. 1998; RIZOS et al. 2004). Esta atividade proliferativa requer controle do ciclo celular e, alterações em seus sinais regulatórios podem resultar em divisão celular não controlada, podendo representar o início do processo de transformação maligna (RIZOS et al. 2004).

O melanoma cutâneo origina-se da transformação maligna dos melanócitos epidérmicos. Este processo é provavelmente multifatorial e resulta de interações complexas entre fatores genéticos, constitucionais e ambientais (ALBINO et al. 1997; SLOMINSKI et al. 2001b).

O *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* definiu a versão final do sistema de estadiamento do melanoma que se tornou oficial em 2002 (Tabela 1). Levando-se em conta a praticidade, reprodutibilidade e a aplicabilidade, foram selecionados critérios que representam fatores prognósticos e que são relevantes para a prática clínica. A pesquisa do linfonodo sentinela foi incorporada ao sistema de estadiamento de pacientes com melanoma primário (BALCH et al. 2001).

A ulceração, a profundidade segundo BRESLOW (1970), o nível de Clark e metástases linfonodais são os principais fatores prognósticos para melanomas cutâneos. (BALCH et al. 2001).

## **1.1 O LINFONODO SENTINELA**

A identificação rotineira e a remoção dos linfonodos regionais em neoplasias sólidas são essenciais para o estadiamento preciso avaliação do prognóstico e

determinação de terapias adjuvantes. Por mais de cem anos linfadenectomias radicais fizeram parte da rotina diagnóstica e terapêutica das doenças metastáticas nodais apesar das morbidades bem estabelecidas como linfedema e lesão neural (SAHA et al. 2004).

Nos últimos vinte anos avanços tecnológicos aumentaram a freqüência da detecção de tumores sólidos em estágios iniciais. A maioria destes pacientes não se beneficiaria com a remoção completa dos linfonodos regionais (SAHA et al. 2004).

O mapeamento do linfonodo sentinela é uma modalidade para o estudo nodal de tumores sólidos livrando os pacientes das co-morbidades associadas à linfadenectomia radical quando este for negativo para metástases.

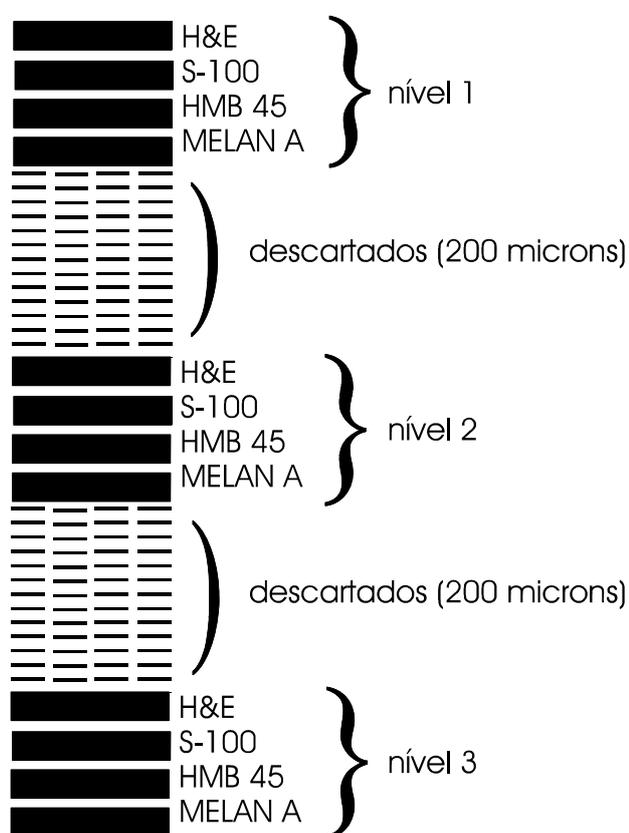
Na década de sessenta surgiu a primeira descrição de linfonodo sentinela. Em 1977, CABANAS, descreveu pela primeira vez a importância fisiológica deste linfonodo em câncer de pênis. Ele postulou que se o primeiro linfonodo de drenagem, o sentinela, for negativo para metástases, os demais linfonodos da região poderiam ser poupados (CABANAS 1977; JAKUB et al. 2003).

Entretanto, o verdadeiro valor do linfonodo sentinela tornou-se evidente após o trabalho pioneiro de MORTON et al. (1992) no manejo do melanoma. Utilizando corante vital Azul Patente V ele provou que o primeiro linfonodo de drenagem de determinado segmento corpóreo, linfonodo sentinela, poderia prever o estado dos linfonodos regionais com 99% de acurácia. A partir de 1990 técnicas de mapeamento do linfonodo sentinela com corantes ou radiofármacos (Tecnécio 99 radioativo) por estudo cintilográfico começou ser bem estabelecida (YUDD et al. 1999; MCMASTERS et al. 1999).

A pesquisa sistemática do linfonodo sentinela em melanoma cutâneo teve início em 1997 no Hospital do Câncer A. C. Camargo (São Paulo). No primeiro ano a pesquisa era realizada nos casos de espessura maior que 0,75 mm ou Nível de Clark igual a IV. A partir de 1998 casos com espessura tumoral maior que 1,0 mm eram submetidos à pesquisa sistemática de linfonodo sentinela. Quando mais finos somente se apresentassem regressão, ulceração ou Clark IV ou maior. O procedimento é realizado três meses após a abordagem inicial. Injeção de solução de Dextran com tecnécio-99 (Tc99) é realizada um dia antes na proximidade da cicatriz ou ao redor da lesão primária. A localização do linfonodo sentinela é definida e marcada com caneta utilizada em radioterapia. Momentos antes da cirurgia, o corante vital Azul Patente é injetado e o sitio de injeção é massageado. Um captador manual de raios gama é utilizado para identificar o linfonodo que apresenta a maior contagem radioativa, sendo que este ao mesmo tempo apresenta-se em azul ou verde no intra-operatório. Realizada a excisão e fixação em solução de formalina 10% tamponada. A análise de 240 casos consecutivos realizada por DUPRAT et al. (2005) verificou que a presença de micrometástases de melanoma cutâneo em linfonodo sentinela ocorreu em 17,5% utilizando-se associação das técnicas de rotina (hematoxilina e eosina) e imunoistoquímica (proteína S100, HMB45 e Melan A).

O procedimento adotado pela Organização Mundial de Saúde-OMS para o exame do linfonodo sentinela preconiza a realização de cortes macroscópicos seccionando o linfonodo longitudinalmente ao maior eixo em pelo menos três cortes paralelos, sendo um deles no hilo linfonodal. São preparados dez cortes histológicos de cada bloco de parafina, sendo realizado estudo imunoistoquímico para proteína S-100 e HMB-45 dos cortes de número um e cinco. No Hospital do Câncer AC

Camargo – São Paulo preconiza-se cortes macroscópicos tantos quantos forem necessários para inclusão total do linfonodo sentinela. De cada bloco de parafina são obtidos cortes histológicos em três níveis diferentes (separados por aproximadamente 200 micras). Em cada um dos níveis obtém-se: uma lâmina contendo cortes histológicos para coloração de rotina (H&E) e reservam-se três lâminas para estudo imunohistoquímico (proteína S-100, HMB-45 e MELAN A) que será realizado sempre que a pesquisa de micrometástase na primeira lâmina (H&E) for negativa.



**Figura 1** - esquema dos preparados histológicos de cada bloco de parafina do linfonodo sentinela realizado no Hospital do Câncer AC Camargo – São Paulo.

## 1.2 DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER – MELANOMA

Desregulação do ciclo celular e crescimento celular descontrolado são considerados pré-requisitos básicos para o desenvolvimento do câncer. O risco individual de melanoma depende basicamente de dois grupos de fatores: características individuais e peculiaridades ambientais. Dentre os fatores de risco potenciais estão exposição solar, número de episódios de queimadura solar, a cor da pele, cabelos e olhos, presença de efélides, número de nevos, uso de protetor solar ou proteção física, dentre outros (BAKOS et al. 2002; BATAILLE 2003; SISKIND et al. 2005).

O melanoma é uma neoplasia que permite estudo de eventos celulares relevantes para a transformação maligna, pois sua história natural mostra estágios progressivos de agressividade do tumor, de acordo com sua capacidade de infiltrar a derme (PARMITER e NOWELL 1993; SU et al. 1995; REED et al. 1995; ROBERTSON et al. 1996; ALBINO et al. 1997; KIM et al. 2002). Assim como na maioria das neoplasias malignas é resultante do rompimento da integridade do genoma dos melanócitos que induz instabilidade sustentada, produzida por alterações cromossômicas, que irão determinar as características neoplásicas destas células (PARMITER e NOWELL 1993; ROBERTSON et al. 1996; ALBINO et al. 1997).

Numerosos são os estudos em busca de anormalidades cromossômicas relacionadas ao melanoma, muitas das quais envolvendo *locus* gênicos relacionados a fatores de proliferação ou de apoptose, já que alterações na expressão ou atividade das proteínas que regulam o ciclo celular determinam o aparecimento e a capacidade

de produzir metástases das neoplasias (KIM et al. 2002; RANE et al. 2002; BURY e CROSS 2003).

### **1.3 O CICLO CELULAR**

O ciclo celular apresenta duas fases funcionais: fase S (síntese) onde ocorre a duplicação do ácido desoxiribonucleico (DNA) e fase M (mitose) onde ocorre a separação de duas células filhas; e duas fases preparatórias: G1 (“Gap” 1 ou intervalo 1) que antecede a fase S (síntese) e G2 (“Gap” 2 ou intervalo 2), preparatória para mitose. A seqüência dos eventos do ciclo celular é controlada por fatores extra e intracelulares (ALBERTS et al. 2002a).

Sinais que levam a célula à divisão celular são controlados por mudanças na concentração e atividade de dois grupos de proteínas: as quinases dependentes de ciclinas (CDK) e as ciclinas, que se unem às CDK ativando-as. Complexos CDK/ciclinas fosforilam grande número de substratos protéicos envolvidos na duplicação de DNA. Sinais mitogênicos estimulam a célula aumentando a concentração intracelular de ciclina D e E. A ativação da ciclina D promove a fosforilação da proteína supressora de tumor retinoblastoma (pRb) que libera fatores transcricionais (E2F e c-abl) necessários para que a célula entre na fase S. Os inibidores das CDK participam do controle regulatório do ciclo celular e são divididas em dois grupos: O primeiro grupo é constituído por proteínas que inibem as ciclinas D, E A. São as proteínas p21, p27 e p57 (famílias Kip/Cip). Este grupo de proteínas evita a ativação do complexo CDK/ciclina pela CAK do DNA, promovendo a parada da célula em G1 por aumento da proteína p53. O segundo

grupo é representado pelas proteínas p16, p15, p18 e p19 que interferem na ligação entre CDK e ciclina inibindo a formação do complexo CDK/ciclina D (ALBERTS et al. 2002 b).

Ciclina D1 é codificada pelo gene CCN1 localizado no cromossomo 11q13 sendo considerado um importante oncogene. WANG et al. (2005) concluíram que a super-expressão de ciclina D1 desregula a proliferação celular e pode induzir mudanças tumorais em tecido mamário através de seu experimento em camundongos transgênicos onde a super-expressão de ciclina D1 em células mamárias promoveu proliferação anormal de células com o desenvolvimento de adenocarcinoma. Está super-expresso em 50% dos carcinomas mamários humanos e camundongos com ausência do gene de ciclina D1 são resistentes ao desenvolvimento de câncer mamário induzido pela ativação da via MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) (SAUTER et al. 2002). O aumento de ciclina D1 é observado em outros tumores e, em geral, pode ocorrer através de vários mecanismos. Em adenomas de paratireóide e linfomas de células do manto é ativada por translocação. Em muitos cânceres incluindo cólon, pulmão, bexiga, mama, ciclina D1 é ativada por amplificação gênica (SAUTER et al. 2002; RAMIREZ et al. 2005). Ciclina D1 também tem mostrado correlação com o estágio, grau e prognóstico de muitas destas neoplasias (GEORGIEVA et al. 2001).

O papel da ciclina D1 no desenvolvimento, progressão e prognóstico do melanoma é controverso. Alguns estudos não mostraram diferenças na expressão de ciclina D1 em nevos e melanomas, enquanto que outros estudos mostraram super-expressão destas proteínas em melanomas do tipo acral (SAUTER et al. 2002). Nível elevado de ciclina D1 também foi encontrado em nevos melanocíticos displásicos e

células de melanoma esporádico (CZAJKOWSKI et al. 2002). Expressão anormal de ciclina D1 tem se mostrado como sendo de pior prognóstico em melanomas uveais (RAMIREZ et al. 2005). Estudos recentes evidenciam que melanomas infiltrativos tendem a perder a expressão de ciclina D1 quanto mais profundos ou em lesões metastáticas (SOARES DE SA 2005).

Um dos elementos constituintes da via pRb do ciclo celular é o proto-oncogene CDK4. Codificado no gene localizado no cromossomo 12q13-14 encontra-se super-expresso em alguns casos de melanoma esporádico. Estudos moleculares têm mostrado a presença neste gene de mutações levando a troca de arginina por cisteína no códon 24 e de asparagina por serina no códon 41, provavelmente responsáveis por intensificação da expressão do gene CDK4. Em melanomas esta alteração torna a proteína resistente à inibição por p16 potencializando o seu papel como oncogene (BARTKOVA et al. 1996). A amplificação deste gene também é observada em câncer de mama e glioblastoma.

O gene CDKN2, localizado no cromossomo 9p21, é um gene supressor de tumores que possui um papel crucial na regulação do ciclo celular e processos de senescência da célula (BATAILLE 2003). A presença de deleções, mutações e rearranjos deste gene, tanto em melanomas familiares quanto em melanomas esporádicos, já foram descritas em diversos estudos (OHTA et al. 1994; HOLLAND et al. 1995; REED et al. 1995; SU et al. 1995; OHTA et al. 1996; FLORES et al. 1996; ALBINO et al. 1997; MANGINI et al. 2002; BENNETT 2003; GREEN e KHAVARI 2003; SVIDERSKAYA et al. 2003). Este gene codifica duas proteínas distintas que atuam no controle do ciclo celular e apoptose. São elas: p16 e p14ARF (BATAILLE 2003). A perda da expressão da proteína p16 em melanomas está

associada à capacidade de invasão e produção de metástases, além da recorrência do tumor e pior prognóstico (HOLLAND et al. 1995; REED et al. 1995; OHTA et al. 1996; SLOMINSKI et al. 1998; MANGINI et al. 2002; ZHANG e ROSDAHL 2004). A proteína p16, em células normais, liga-se às CDK4 e CDK6, inibindo a formação do complexo CDK-ciclina D e subseqüentemente evitando a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb), o que resulta na parada do ciclo celular. O desequilíbrio deste processo produz crescimento celular descontrolado e desenvolvimento tumoral (GRANA e REDDY 1995; ELLEDGE 1996; SHERR e ROBERTS 1996; BURY e CROSS 2003; SVIDERSKAYA et al. 2003; RIZOS et al. 2004).

O gene WAF1, localizado no cromossomo 6p, é também um gene supressor de tumor, com papel na supressão do crescimento de melanoma. Codifica a proteína p21, sendo um dos principais genes efetores que participam do controle do ciclo celular (KARJALAINEN et al. 1999; MANGINI et al. 2002).

#### **1.4 AS METALOPROTEINASES**

As metaloproteinases (MMPs) pertencem à família de endopeptidases dependentes de zinco e estão envolvidas na degradação da matriz extracelular em ambas as situações: fisiológicas e patológicas. Pelo menos vinte e um membros foram descritos baseados na estrutura e substrato específico. Destacando-se as colagenases 1 (MMP-1), 2 (MMP-8), 3 (MMP-13) e 4 (MMP-18) que são as principais proteases capazes de clivar o colágeno fibrilar (I, III e V). Os fragmentos

gerados são degradados novamente pelas gelatinase A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9) que também degrada componentes da membrana basal como colágeno tipo IV, crucial para a invasão tumoral (PASCO et al. 2004; NGUYEN 2004; HOFMANN et al. 2005; TURPEENNIEMI-HUJANEN 2005).

Outras MMPs são: estromelisina-1 (MMP-3) e estromelisina-2 (MMP-10), estromelisina-3 (MMP-11) e metaloelastase (MMP-12). Principalmente expressa em células epiteliais tem-se a matrilisina (MMP-7).

Até o momento, seis diferentes MMPs de tipo-membrana foram identificadas e divididas em dois subgrupos de acordo com sua ancoragem na membrana. MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16) e MT5-MMP (MMP-24) são ancoradas na membrana celular através de um domínio transmembrana localizado na porção C-terminal final. MT4-MMP (MMP-17) e MT6-MMP (MMP-25) são ligadas às células pela porção C-terminal à âncora de glicosil fosfatidilinositol (GPI). Todas as MT-MMPs podem ativar a pro-MMP-2 e a maioria delas degrada os componentes da matriz extra celular (PASCO et al. 2004).

A atividade proteolítica das MMPs é especificamente inibida pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), uma família composta por quatro membros, TIMP-1 a TIMP-4 (PASCO et al. 2004).

Durante o desenvolvimento e a progressão do melanoma alterações histológicas tornam-se nítidas, como crescimento aberrante de células e migração com formação de grupamentos celulares que invadem a derme e promovem metástases (GRUSS e HERLYN 2001). Estudos comprovam o aumento da expressão de MMP-2 em melanomas avançados e a expressão de MMP-9 limitada aos estágios iniciais de melanoma (HOFMANN et al. 2005).

## 1.5 AS INTEGRINAS

A interação entre as células tumorais e macromoléculas da matriz extracelular são mediadas por receptores de adesão específicos da superfície celular, as integrinas.

Integrinas são heterodímeros compostos de uma associação não covalente de duas subunidades trans-membranas  $\alpha$  e  $\beta$ . Esta família de receptores é formada por 18 subunidades  $\alpha$  e 9 subunidades  $\beta$  que dimerizam-se para formar pelo menos vinte e quatro heterodímeros diferentes.

A integrina  $\alpha\beta3$  está envolvida em processos biológicos como a angiogênese tumoral, bem como em diversos aspectos da evolução de melanomas, participando no processo de adesão das células através de seu sítio de ligação, a vitronectina (LI et al. 2001; SCATENA e GIACHELLI 2002; TRIKHA et al. 2002). O aumento da expressão da subunidade  $\beta3$  parece estar relacionado com a progressão do melanoma, uma vez que melanócitos normais não expressam a integrina  $\alpha\beta3$ ; células do nevo melanocítico displásico apresentam pouca expressão e o melanoma, bem como suas metástases, apresentam expressão intensa (TRIKHA et al. 2002). SIMONATO et al. (2005) mostraram que não houve diferença entre a expressão de  $\alpha\beta3$  em melanomas invasivos com espessuras diferentes, bem como melanomas metastáticos. Entretanto, a expressão de altos níveis de  $\alpha\beta3$  em melanomas “in situ” pode ser relacionada ao fenótipo pré invasivo do tumor. Existem relatos de que a expressão de  $\alpha\beta3$  coincide com a ativação de metaloproteinase-2 (MMP2), tanto em melanomas invasivos e metástases in vivo quanto in vitro,

concluindo que ambos os fatores seriam necessários para o desenvolvimento de invasão local e metástases (HOFMANN et al. 2000a).

## 1.6 O TISSUE ARRAY

A técnica de *tissue microarray* (TMA) foi descrita em 1998 por KONONEN et al. e permite a avaliação de centenas de amostras teciduais, fixadas em formalina em bloco de parafina, em uma única lâmina. Sendo assim, podem-se utilizar amostras de tecidos em blocos de parafina que compõem os arquivos de patologia, para estudo em larga escala de diversos marcadores, com economia de tempo e gastos.

Diversos estudos têm utilizado a técnica de TMA como uma ferramenta importante para pesquisa de DNA, mRNA, expressão de proteínas, receptores hormonais, dentre outros. KONONEN et al. (1998) detectaram seis ampliações gênicas, bem como expressão de receptor de estrógeno e proteína p53 em câncer de mama em cortes de microarray com centenas de amostras provando a eficácia deste método (KONONEN et al. 1998).

HOSS et al. (2001) concluíram que a análise de três amostras (triplicata) de 0,6mm de diâmetro confere ao TMA um poder de análise de tecidos tumorais sem comprometimento da eficácia podendo ser usado como uma ferramenta de análise clinico-patológica.

Diversos autores têm utilizado esta técnica para o estudo de alterações gênicas e expressão de diversas proteínas envolvidas na gênese, progressão, invasão e capacidade de produzir metástase de melanomas primários de tipos histológicos

variados e em diversos estágios, melanoma metastático e metástases (SAUTER et al. 2002; ALONSO et al. 2004; BACHMANN et al. 2004).

Porém, os melanomas *in situ* e melanomas finos, com espessura menor que 1mm, muitas vezes não apresentam amostra tumoral suficiente para inclusão em TMA. Daí, a técnica disponível para análise de expressão protéica através do estudo imunohistoquímico continua sendo a convencional: com cortes histológicos de 4 micra em lâmina de vidro tratada previamente com silano®.

O Hospital do Câncer tem sido referência no atendimento e tratamento de pacientes com melanoma cutâneo. Nos últimos anos foram estudados de forma padronizada os linfonodos sentinelas em mais de 240 casos de melanoma cutâneo. A experiência acumulada demonstra resultados similares aos maiores centros mundiais de tratamento do melanoma, sendo a positividade para micrometástases de 18% por paciente estudado, considerando-se a avaliação por Hematoxilina e Eosina acompanhada de estudo imunohistoquímico por HMB-45 e Proteína S-100. Trata-se de uma amostra única que possibilitará a avaliação de fatores relacionados à capacidade de produzir metástases, tais como adesão celular, migração e ciclo celular. Este será o principal objetivo do presente estudo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Estudar a expressão das proteínas controladoras do ciclo celular (Ciclina D1, CDK4, p16ink4, p21WAF1), da adesão celular (integrina  $\alpha\beta3$ ) e enzimas proteolíticas através da ativação da metaloproteinase-2 (MMP-02) e metaloproteinase-9 (MMP-09) em lesões cutâneas de melanomas que evoluíram com e sem metástases em linfonodo sentinela, por estudo imunoistoquímico.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO**

1. Verificar se há diferença na expressão destas proteínas nos melanomas cutâneos com e sem metástases em linfonodos sentinela.
2. Estabelecer se há correlação entre as variáveis estudadas e parâmetros prognósticos histopatológicos.

### **2.3 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

1. Preparo de *tissue array* de melanomas primários de pacientes submetidos a estudo do linfonodo sentinela.
2. Criação de banco de dados com pacientes portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente identificado pelo número 606/06.

#### **3.2 DESCRIÇÃO DO ESTUDO**

Em estudo retrospectivo, foram coletadas amostras de melanoma cutâneo primário diagnosticados no Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A C Camargo, de pacientes submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela, no período de 1998 a 2002. Estudo imunoistoquímico dos marcadores biológicos citados anteriormente foram realizados em lâminas convencionais (cortes de 3 micra em lâmina com silano) para os casos de melanomas primários com espessura de Breslow menor que 1mm e em lâminas de *Tissue micro array* para os casos de melanomas primários com espessura de Breslow maior que 1mm.

### **3.3 REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS**

Os prontuários dos pacientes foram revistos para análise de variáveis demográficas (sexo, idade e localização do tumor), de estadiamento, tratamento e evolução clínica (sobrevida livre de doença, câncer específica e global).

### **3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- Pacientes cujo diagnóstico de melanoma foi realizado no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer, submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela, com blocos de parafina disponíveis nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica e que contenham material suficiente para o estudo.
- Pacientes cujo seguimento clínico encontrado nos prontuários seja de pelo menos dois anos a partir do diagnóstico histopatológico de melanoma.

### **3.5 MÉTODO**

Os preparados histológicos foram revistos e classificados de acordo com o protocolo diagnóstico estabelecido na Instituição, em consonância com o Consenso de relatório histopatológico proposto pelo Grupo Brasileiro de Melanoma (Acta Oncológica Brasileira Fev 2004).

Foram avaliados os seguintes critérios:

- a. **Tipo histológico:** foram considerados: lentigo maligno melanoma, melanoma extensivo superficial, melanoma acral lentiginoso, melanoma nodular e outros (melanoma desmoplásico, neurotrópico, nevíde, spitzóide e verrucoso.). Sabe-se que a fase *in situ* do melanoma tem períodos variáveis de evolução para fase infiltrativa, sendo muita longa no lentigo maligno melanoma e curta no extensivo superficial e acral lentiginoso. Na fase infiltrativa alguns tipos de melanoma parecem se comportar de forma mais agressiva como o melanoma nodular.
- b. **Fase de crescimento:** são consideradas as fases de crescimento:
- Radial: não tumorigênica; *in situ* e/ou microinvasiva, caracterizada por crescimento indolente mas progressivo. As células melanocíticas na derme não apresentam mitoses, crescimento expansivo ou necrose e estão isoladas ou em pequenos grupamentos.
- Vertical: invasiva, caracterizada por crescimento infiltrativo da derme, com alto grau de atipia nuclear, mitoses, invasão dos tecidos adjacentes e necrose. Em lesões pouco espessas utiliza-se três critérios: a) ninhos dérmicos maiores que os epidérmicos; b) qualquer mitose dérmica; c) ninhos de qualquer tamanho com crescimento expansivo nítido, comprimindo a derme adjacente.
- c. **Nível de Clark:** determinado pelos cinco níveis definidos por Wallace Clark (CLARK et al. 1969). São eles:
- Nível I: limitação das células de melanoma à epiderme e seus apêndices.
- Nível II: extensão à derme papilar com poucas células de melanoma estendendo-se à interface entre a derme papilar e a reticular.

Nível III: extensão das células tumorais por toda a derme papilar sem invadir a derme reticular

Nível IV: invasão da derme reticular.

Nível V: invasão da tela subcutânea.

- d. **Profundidade segundo Breslow:** estabelecida por Alexander Breslow em 1970 refere-se à medida objetiva em milímetros entre o topo da camada granulosa e a extensão mais profunda do tumor. Nos casos de ulceração a medida é feita entre a base da úlcera e o ponto mais profundo de invasão (BRESLOW 1970). O estadiamento da AJCC em 2001 definiu este parâmetro como sendo o de maior impacto na determinação da sobrevida global.
- e. **Índice mitótico:** avaliado em lesões em fase vertical de crescimento, na área de maior concentração de mitoses, e, equivale a quantidade de mitoses em aproximadamente  $1\text{mm}^2$  (10 campos de grande aumento na objetiva de 40x).
- f. **Infiltrado linfocitário intratumoral:** infiltrado de linfócitos entre as células tumorais na base do tumor, permeando as células neoplásicas, formando “rosetas” ao redor de células tumorais e apresentando evidências histológicas de degeneração das células neoplásicas.
- g. **Infiltrado linfocitário peritumoral:** infiltrado de linfócitos ao redor da área tumoral.
- h. **Invasões angio-linfática e perineural:** células neoplásicas no interior de vasos sanguíneos e linfáticos e, invasão do perineuro de filetes nervosos.
- i. **Ulceração:** definida como solução de continuidade da epiderme, substituída por tampão fibrino-leucocitário sobre a área tumoral. Considerada como fator de alto risco de metástase. O índice de sobrevida de pacientes com melanoma

ulcerado é proporcionalmente menor que aquele de pacientes com melanoma não ulcerado da mesma categoria T, equivalendo-se ao índice de sobrevida de pacientes com melanoma não ulcerado de uma categoria T acima (BALCH et al. 2001)

- j. Regressão:** área do tumor onde se observa tecido fibroso cicatricial, na ausência de biópsia prévia, e aumento da vascularização com ou sem linfócitos e melanófagos, além da ausência de células neoplásicas na epiderme e na derme. As opiniões entre os autores são controversas em relação à associação entre regressão e pior prognóstico do tumor (BLESSING et al. 1990).
- k. Satelitose microscópica:** representada por metástase cutânea (dérmica ou subcutânea), sob a forma de focos descontínuos de tumor em um diâmetro de 5 cm com relação ao tumor primário.
- l. Margem cirúrgica:** a margem de ressecção cirúrgica de melanomas é baseada na espessura do tumor. Margem de 1cm está adequada a tumores com menos de 1mm de espessura e margem com 2cm está adequada a tumores de espessura entre 2 e 4 mm (COOK J 2004) Mais estudos clínicos são necessários para definir a margem cirúrgica para melanomas com espessura maior de 4 mm, embora o estudo retrospectivo envolvendo M.D. Anderson Cancer Center e Lakeland Regional Cancer Center, com relação à recorrência local, sobrevida e margens de excisão tenha revelado que não houve aumento nos índices de recorrência local nem diminuição da sobrevida quando margens de 2cm ou menos foram empregadas, comparadas com pacientes que tiveram melanomas de espessura e fatores prognósticos

similares que tiveram margens maiores que 2cm. Portanto, margens de 2cm podem seguramente ser empregadas para lesões espessas (HEATON et al. 1998).

**Quadro 1 - Classificação TNM do Melanoma (AJCC 2002)**

<b>T</b>	<b>Espessura</b>	<b>Ulceração</b>	
Tis	Melanoma <i>in situ</i>		
T1	≤ 1 mm	a: ausência de ulceração e nível II/III	b: com ulceração ou nível IV/V
T2	1 – 2 mm	a: ausência de ulceração	b: com ulceração
T3	2 – 4 mm	a: ausência de ulceração	b: com ulceração
T4	> 4 mm	a: ausência de ulceração	b: com ulceração
<b>N</b>			
	<b>No linfonodos metastáticos</b>	<b>Infiltração tumoral do linfonodo</b>	
N1	1 linfonodo	a: micrometástases*	
		b: macrometástase**	
N2	2 – 3 linfonodos	a: micrometástases*	
		b: macrometástase**	
N3	4 ou mais linfonodos metastáticos, ou linfonodos confluentes, ou metástases em trânsito / satelitoses com linfonodos metastáticos		
* micrometástases são diagnosticadas após pesquisa de linfonodo sentinela ou linfadenectomia eletiva			
**macrometástases são definidas como metástases em linfonodo, clinicamente detectável, confirmado por linfadenectomia terapêutica ou quando a metástase linfonodal exibe extensão extracapsular macroscópica			
<b>M1</b>			
	<b>Localização</b>	<b>DHL no soro</b>	
M1a	Metástase cutânea, subcutânea ou nodal à distância	Normal	
M1b	Metástase em pulmão	Normal	
M1c	Metástases em outras víceras	Normal	
	Qualquer metástase	elevado	

**Quadro 2 - Estadiamento clínico e patológico do Melanoma (AJCC 2002)**

<b>Estadiamento clínico*</b>				<b>Estadiamento patológico+</b>			
	T	N	M		T	N	M
<b>0</b>	Tis	N0	M0	<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1a	N0	M0	<b>IA</b>	T1a	N0	M0
<b>IB</b>	T1b	N0	M0	<b>IB</b>	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
<b>IIA</b>	T2b	N0	M0	<b>IIA</b>	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
<b>IIB</b>	T3b	N0	M0	<b>IIB</b>	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
<b>IIC</b>	T4b	N0	M0	<b>IIC</b>	T4b	N0	N0
<b>III</b>	QqT	N1	M0	<b>III</b>			
		N2					
		N3					
<b>III</b>	QqT	QqN	M1	<b>IIIA</b>	T1-4a	N1a	M0
					T1-4a	N2a	M0
				<b>IIB</b>	T1-4b	N1a	M0
					T1-4b	N2a	M0
					T1-4a	N1b	M0
					T1-4a	N2b	M0
					T1-4a/b	N2c	M0
				<b>IIIC</b>	T1-4b	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					QqT	N3	M0
<b>IV</b>	QqT	QqN	M1	<b>IV</b>	QqT	QqN	M1

\*estadiamento clínico inclui microestadiamento do melanoma primário e avaliação clínica e radiológica para metástases.  
+estadiamento patológico inclui microestadiamento do melanoma primário e informações patológicas a respeito dos linfonodos regionais após linfadenectomia parcial ou completa.

## **A Construção e análise do *tissue microarray* (TMA)**

### **1 Confecção do bloco de parafina de TMA**

A partir do corte original corado em HE as áreas de tumor são marcadas com caneta e servem de guia para identificação da área equivalente a ser puncionada no bloco “doador”. O cilindro de tecido retirado do bloco doador foi transferido para o bloco receptor através do uso do equipamento disponível no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer: *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA).

O bloco de TMA foi confeccionado com cilindros de 1mm de diâmetro de 134 amostras de tumores que correspondem a melanomas de 67 pacientes representados em duplicata. Foram incluídas amostras de 12 nevos melanocíticos intradérmicos que serviram de controle das reações. Utilizou-se um cilindro de tecido hepático para orientação inicial de cada seqüência dos casos utilizados.

### **2 Confecção das lâminas de vidro**

A partir do bloco de TMA foram preparados 100 cortes histológicos seriados em lâminas de vidro previamente tratadas com película aderente especial (Instrumedics USA) na espessura de 5  $\mu$ m.

As lâminas 01, 10, 40, 60, 80 e 100 foram coradas com Hematoxilina e Eosina para controle da representatividade do material. As lâminas 02 e 12 foram utilizadas para reação de imunistoquímica para ciclina D1, bem como as lâminas 03 e 13 para CDK4, 04 e 14 para p16, 05 e 15 para p21, 06 e 16 para MMP-2, 07 e 17 para MMP-9 e 08 e 18 para  $\alpha$ v $\beta$ 3.

Através de uma planilha realizada em Excel® (Windows® – Microsoft® office) foi possível localizar cada caso nas lâminas do TMA.

### **3 Estudo Imunoistoquímico**

Os seguintes marcadores biológicos foram utilizados no estudo:

- Anti-ciclina D1 – mouse anti-human – clone DCS-6 Dako cat. M7155 (diluição 1/50)
- Anti-CDK4 – mouse anti-human – Santa Cruz – Cat. SC-260 (diluição 1/100)
- Anti p16ink4a, clone DCS-50 1/h4 Oncogene Cat. NA29, anticorpo mouse anti-human – DAKO (diluição 1/100)
- Anti p21WAF1(Ab-1) – clone EA10 – Oncogene cat 0p64T– DAKO anticorpo monoclonal (BV4) (diluição 1/20)
- anti-integrina  $\alpha v \beta 3$  – Abcam, UK – cod. Ab7167-50 (diluição 1/10)
- MMP-02 – rabbit antibody – Lab Vision Corporation – RB9233-P (diluição 1/200)
- MMP-09 – rabbit antibody – Lab Vision Corporation – RB9234-P (diluição 1/50)

### **4 Protocolo de Reações**

1. As lâminas de vidro foram previamente tratadas com 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma, A-3648, USA) e deixadas por 24 horas em estufa a 60°C.

2. Foram submetidas à desparafinização em xilol a 60°C por 20 minutos e então em xilol à temperatura ambiente por 20 minutos.
3. Posteriormente foi realizada a preparação das lâminas através de passagens sucessivas em etanol por 30 segundos (100%, 95% e 70%) e então lavagem em água corrente por 5 minutos.
4. As lâminas foram submetidas à recuperação antigênica pelo calor, utilizando-se panela elétrica ou “banho Maria” e solução tampão citrato 10 mM pH 6,0 e EDTA tris pH 9,0 respectivamente. Seguida de resfriamento em temperatura ambiente por 20 minutos e lavagem em água corrente por 5 minutos.
5. A seguir, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol.), com quatro trocas de 5 minutos cada, seguida de lavagens com solução salina tamponada com fosfatos (PBS - *phosphate buffered saline* – 10 mM e pH 7,2) por 5 minutos.
6. Incubaram-se as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, em tampão PBS, contendo albumina bovina (BSA) a 1% (SIGMA, A9647, USA) e azida sódica (NaN<sub>3</sub>) a 0,1%, por 18 horas, a 4°C, em câmara úmida (over night).
7. Após a incubação, lavaram-se as lâminas em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada.
8. Iniciou-se, então, a incubação das lâminas com o anticorpo secundário biotilado-reagente C (Biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig) do kit StreptABCComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (Dako A/S, K492, Denmark) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C e posterior lavagem em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada.

9. Incubou-se, então, o complexo reagente A (Streptavidin) no título pré-estabelecido de 1:200 e reagente B (Biotinylated Peroxydase) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C e posterior lavagem em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada.
10. As lâminas foram então incubadas em solução substrato 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 60mg%(Sigma, D-5637 USA), 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 1mL de água oxigenada 6%, 100mL de PBS, por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.
11. Após a observação do desenvolvimento do precipitado castanho, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por 5 minutos.
12. Metade das lâminas foi contra-corada com Hematoxilina de Harris (Merk) por 1 minuto. Imersão em solução de hidróxido de amônio a 0,5% e lavagem com água corrente por 5 minutos. E a outra metade foi contra-corada pelo método Giemsa.
13. Seguiram-se, então, a desidratação das lâminas em etanol (79%, 80%, 95% e 100%), passagem em xilol (três banhos) e subseqüente montagem das mesmas para a leitura.
14. As reações foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado, e controle negativo, realizado pela omissão do anticorpo primário.

## **5 Leitura das lâminas**

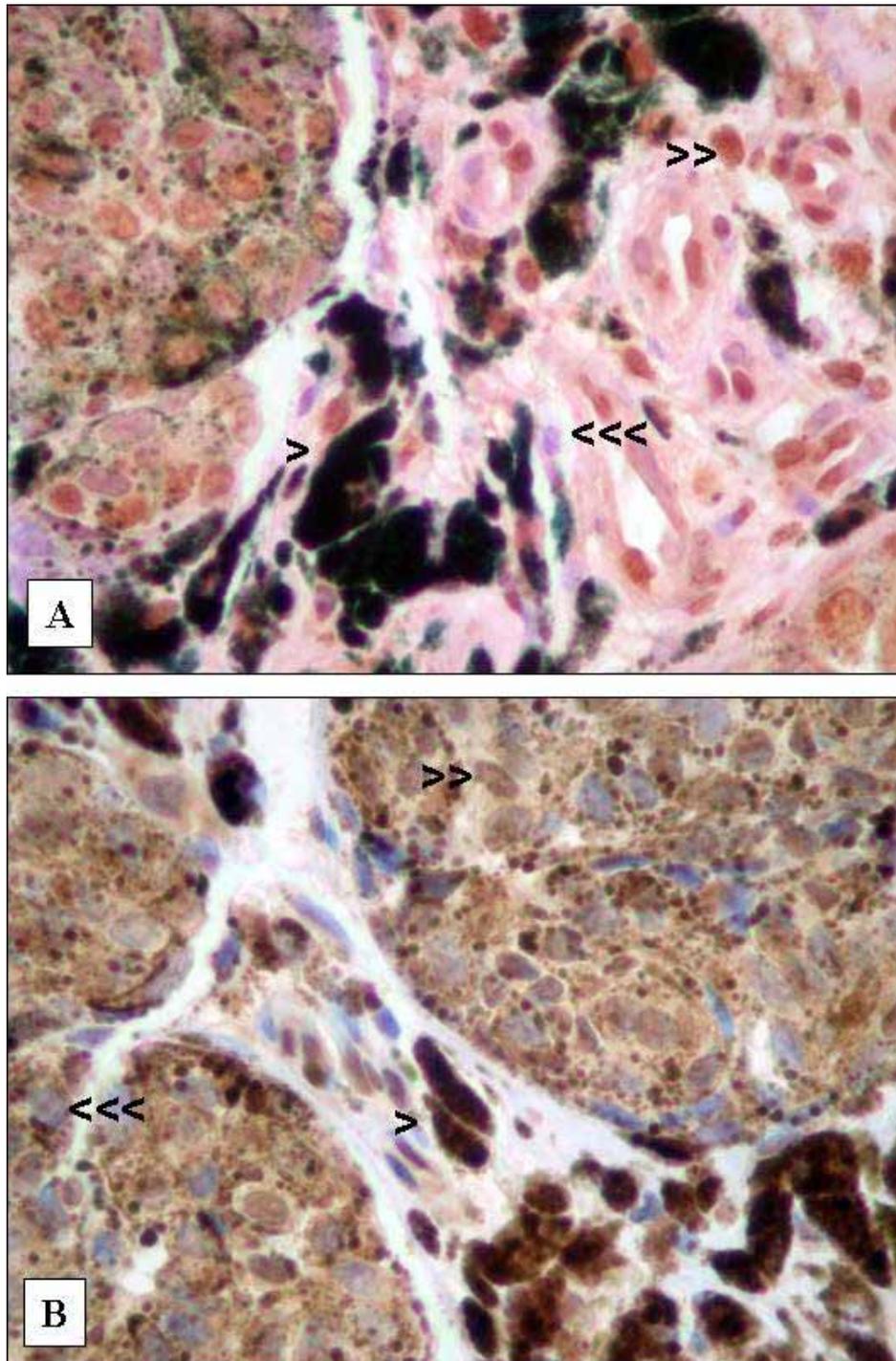
As lâminas de TMA foram analisadas considerando válida a observação de pelo menos vinte e cinco por cento do tecido representado. Foram realizadas, quando

sem perda tecidual, quatro observações de cada amostra, por dois patologistas distintos e o resultado destas observações foram comparados e as divergências foram revistas para uniformidade dos resultados minimizando a possibilidade de erros de observação.

Para cada marcador histoquímico duas lâminas de TMA foram analisadas, sendo uma contra-corada com Hematoxilina de Harris e outra com Giemsa. Esta última permite distinguir com mais facilidade a expressão positiva por peroxidase (marrom) da melanina presente em algumas células tumorais como mostram as Figuras 2 e 3.

Para marcadores nucleares utilizou-se método semi-quantitativo considerando-se a proporção de células dentro do tumor com positividade nuclear. O ponto de corte para cada anticorpo foi determinado através de dados da literatura e está representado no Quadro 3 (REED et al. 1995; MAELANDSMO et al. 1996; KARJALAINEN et al. 1999; FLORENES et al. 2000; KLAES et al. 2001; ALONSO et al. 2004).

<b>AC</b>	<b>NEGATIVO</b>	<b>POSITIVO</b>
p16	< 5%	≥ 5%
p21	< 10%	≥ 10%
Ciclina D1	< 5%	≥ 5%
CDK 4	< 5%	≥ 5%



**Legenda:** **A)** Contra coloração pelo método de Giemsa onde se observa pigmento melânico (>) em verde escuro, núcleos com expressão positiva (>>) em castanho e núcleos com expressão negativa (>>>) em roxo. **B)** Contra coloração pelo método de Hematoxilina de Harris onde não se observa diferenciação acentuada entre a expressão positiva (castanha) e o pigmento melânico.

**Figura 2** – Visualização ao microscópio óptico de células tumorais pela técnica de imunohistoquímica contra corada pelos métodos de Giemsa e Hematoxilina de Harris para marcação nuclear (p16).

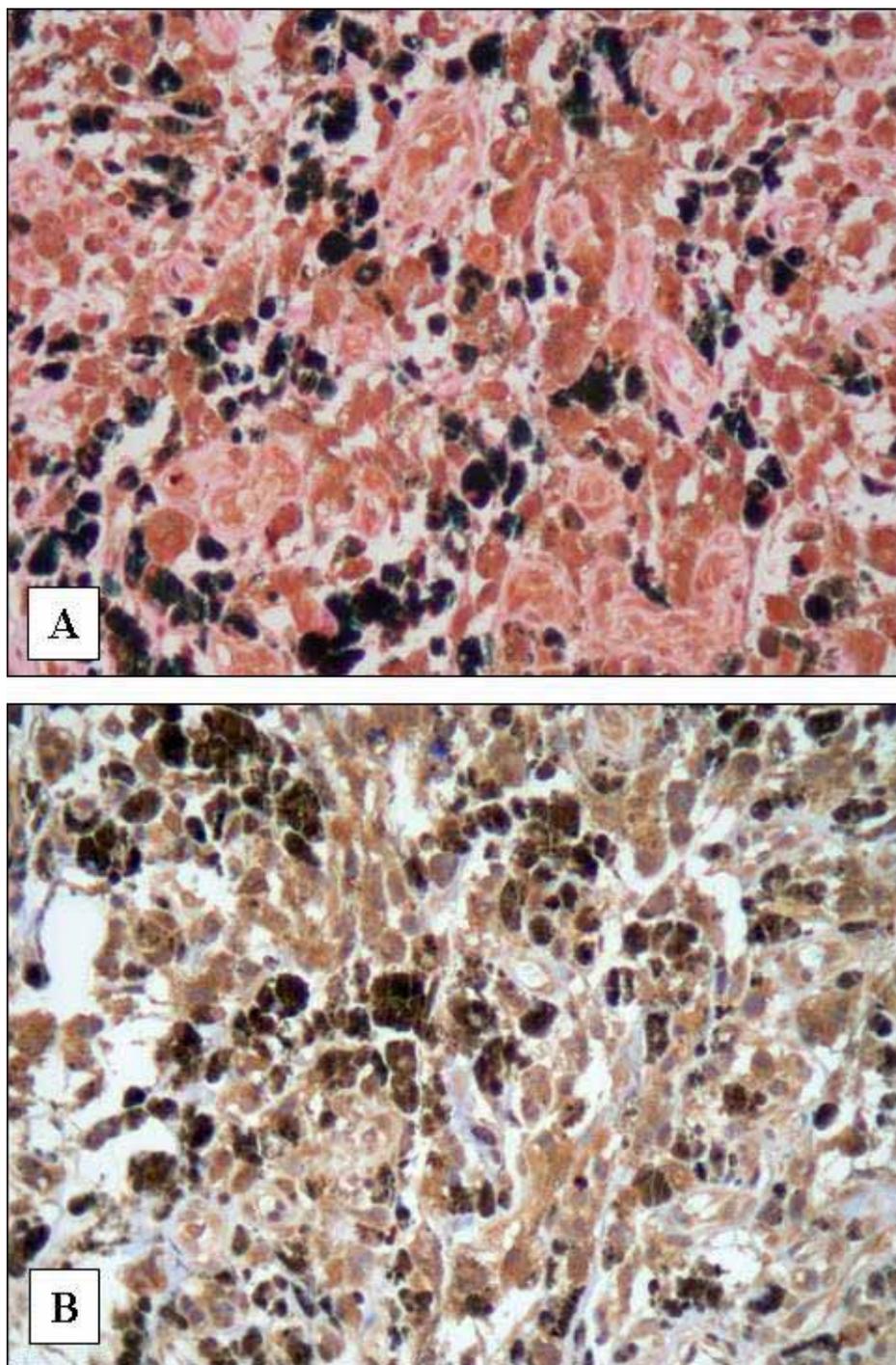
Para o anticorpo anti-cdk4 e  $\alpha\beta3$  utilizou-se método semi-quantitativo considerando-se a intensidade da marcação e a proporção de células tumorais marcadas baseado em dados de literatura (SOINI et al. 2001; BACHMANN et al. 2004). A pontuação final foi determinada através da soma dos escores de intensidade e proporção. Foram considerados positivos os casos com soma de escores final maior que 4.

<b>Cdk4 - marcação citoplasmática</b>	
<b>Intensidade</b>	<b>Proporção de células marcadas</b>
0 = negativo	0 = negativo
1 = fraca	1 = 1 a 10%
2 = moderada	2 = 11 a 50%
3 = forte	3 = mais de 50%

Para os anticorpos MMP-2 e MMP-9 utilizou-se método semi-quantitativo considerando-se a intensidade da marcação nuclear e citoplasmática.

<b>MMP- 2 e MMP-9</b>	
<b>Nuclear</b>	<b>Citoplasmática</b>
0 = negativo	0 = negativo
1 = fraca	1 = fraca
2 = moderada	2 = moderada
3 = forte	3 = forte

A pontuação final foi determinada através da multiplicação dos escores de nuclear e citoplasmática. Foram agrupados os escores finais em: 0: negativo, 1 a 3: leve, 4 a 6: moderada e 7 a 9: intenso.



**Legenda:** **A)** Contra coloração pelo método de Giemsa onde se observa pigmento melânico em verde escuro, núcleo e citoplasma com expressão positiva em castanho. **B)** Contra coloração pelo método de Hematoxilina de Harris onde não se observa diferenciação acentuada entre a expressão positiva (castanha) e o pigmento melânico no núcleo e citoplasma das células tumorais.

**Figura 3** - Visualização ao microscópio óptico de células tumorais pela técnica de imunohistoquímica contra corada pelos métodos de Giemsa e Hematoxilina de Harris para marcação nuclear e citoplasmática.

## 6 Análise estatística

As informações coletadas foram armazenadas em banco de dados informatizado e analisadas através do programa *Statistical Package for Social Science – SPSS®* (versão 13.0).

As descrições da população, o exame anatomopatológico, o status linfonodal e os resultados obtidos a partir da IHQ foram realizadas por meio de estatística descritiva (média, desvio-padrão-dp, mediana e porcentagens).

A associação entre a micrometástase no linfonodo sentinela e as variáveis sociodemográficas, histopatológicas e moleculares foi avaliada ou pelo teste de qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher, dependendo dos valores esperados nas tabelas de contingência. O teste de qui-quadrado foi utilizado quando a tabela de contingência continha freqüências esperadas abaixo de 5 em até 20,0% das caselas e nenhuma freqüência esperada abaixo de 2. Quando estas condições foram violadas, empregou-se o teste exato de Fisher (DAWSON-SAUNDERS e TRAPP 2004). Nesta etapa, algumas variáveis quantitativas ou outras qualitativas com mais de 2 categorias foram testadas com diversos pontos de corte. As variáveis com nível descritivo de até 0,150 foram selecionadas para o modelo de regressão logística múltipla. Na análise múltipla, empregou-se a estratégia de modelagem do tipo *stepwise forward selection* e estipulou-se o nível de significância em 5,0%. A estimativa de risco para a presença de metástase em linfonodo sentinela foi o *odds ratio* (OR) obtido da regressão logística múltipla.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA**

Foram revistos os prontuários de 270 pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo, submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela no período de 1998 a 2002. A idade média ao diagnóstico foi de 52 anos e mediana de 51 anos. Cinquenta e quatro por cento dos pacientes apresentaram idade acima de 50 anos. Houve predomínio de melanomas em fase vertical de crescimento (89%) (tabela 3), com nível de Clark III (52%), seguido de nível de Clark IV (27%), sendo apenas 24% deles com espessura de Breslow menor que 1mm, dos quais, metade apresenta espessura maior que 0,76mm. A pesquisa de linfonodo sentinela revelou positividade para metástases em 11,8 % com coloração de hematoxilina eosina, aumentando a positividade para 17% quando associada à pesquisa por imunohistoquímica com HMB45 e S100.

Foram separados 207 blocos de parafina do arquivo de blocos da Anatomia Patológica correspondentes a 118 pacientes com melanoma submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela. Alguns casos possuíam mais de um bloco de parafina do tumor primário. Verificou-se que 113 casos de ampliação de margens e pesquisa de linfonodo sentinela foram encaminhados ao Hospital do Câncer sem o respectivo bloco de parafina do tumor primário. Estavam ausentes do arquivo blocos de parafina de tumores de 39 pacientes.

Dos 118 casos disponíveis 67 apresentaram blocos de parafina com material suficiente para inclusão no TMA; 19 casos de melanoma com espessura de Breslow

menor que 1 mm os quais foram utilizados para confecção de cortes em lâmina convencional e 32 casos não apresentaram material suficiente para confecção de lâminas, sendo excluídos do estudo. Dois casos foram excluídos do estudo porque a pesquisa intraoperatória do linfonodo sentinela foi negativa.

Portanto, foram incluídos no estudo 84 casos de melanoma primário de pacientes submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela.

## **4.2 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS**

A idade ao diagnóstico variou de 27 a 79 anos (média = 53,11 dp:14,2 e mediana = 52) sendo 56% dos pacientes com idade superior aos 50 anos. Houve predomínio de mulheres (53%). Quanto à localização do tumor primário 65,5% localizavam-se nos membros, seguido do tronco (33,3%) e, somente um caso em cabeça e pescoço (1,2%) conforme a Tabela 1. Com relação ao estadiamento clínico observou-se no início do estudo predomínio do estadio IA, seguido de uma distribuição relativamente uniforme entre os demais estádios. Ao final do estudo observou-se diminuição da incidência dos estádios IIB, IIC e III com aumento do estadio IV conforme mostra a Tabela 2.

### **4.3 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS**

Com relação ao tipo histológico houve predomínio do tipo extensivo superficial (59,5%), seguido do tipo acral (28,6%), nodular (8,3%), outros (2,4%) e lentigo maligno melanoma (1,2%). Em 95,2% dos tumores encontrou-se fase de crescimento vertical. Com relação aos níveis estabelecidos por Clark nenhum caso foi classificado como Clark I; 12 casos foram Clark II (14,3%), 39 casos foram Clark III (46,4%), 21 casos foram Clark IV (25%) e 12 casos foram Clark V (14,3%). Verificou-se espessura de Breslow menor que 1mm em 23 casos (27,4%), espessura maior que 1 mm e menor que 2mm em 22 casos (26,2%), espessura maior que 2 mm e menor que 4mm em 19 casos (22,6%) e maior de 4mm em 20 casos (23,8%). 14 casos não apresentavam mitoses em 10 CGA (16,7%), de 1 a 6 mitoses foram encontradas em 42 casos (50%) e mais de 6 mitoses em 28 casos (33,3%). Não foi observada invasão vascular. Apenas 1 caso apresentou invasão linfática e 5 casos apresentaram invasão neural. Com relação ao infiltrado inflamatório linfocitário, do tipo intratumoral, estava ausente em 69,9% dos casos (58 casos) e, do tipo peritumoral, presente em 88% dos casos (73 casos). A maioria dos casos 81% (68 casos) não apresentava áreas de regressão e a ulceração estava presente em 33 casos (39,3%). Microsatelitose foi encontrada em apenas 5 casos (6%). As margens de ressecção cirúrgica estavam comprometidas em 21,4% dos casos (18%). A pesquisa de metástases em linfonodo sentinela resultou negativa em sessenta e quatro casos (76%), sendo, portanto, positiva em vinte casos (24%). Com relação ao estadiamento

patológico observou-se aumento dos estadios III e IV ao final do estudo conforme mostra a Tabela 3.

**Tabela 1** - Número e porcentagem de pacientes segundo as variáveis demográficas e clínicas. (Hospital do Câncer AC Camargo. 1998-2004).

<b>Variável</b>	<b>Categoria</b>	<b>n (*)</b>	<b>(%)</b>
<b>sexo</b>	Feminino	45	(53,6)
	Masculino	39	(46,4)
<b>Idade</b>	< 50 anos	36	(42,9)
	≥ 50 anos	48	(57,1)
<b>Localização do tumor</b>	Cabeça e pescoço	1	(1,2)
	Tronco	28	(32,9)
	Extremidades	55	(64,7)

**Tabela 2** - Número e porcentagem de pacientes segundo o estadiamento clínico definido pelo AJCC - 2002. (Hospital do Câncer AC Camargo. 1998-2004).

<b>Estadiamento</b>	<b>Inicial</b>		<b>Final</b>	
	<b>n</b>	<b>(%)</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
IA	22	(26,2)	22	(26,2)
IB	11	(13,1)	10	(11,9)
IIA	16	(19,0)	14	(16,7)
IIB	10	(11,9)	8	(9,5)
IIC	9	(10,7)	4	(4,8)
III	16	(19,0)	10	(11,9)
IV	0	-	16	(19,0)

**Tabela 3** - Número e porcentagem de pacientes segundo o estadiamento patológico definido pelo AJCC - 2002. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

Estadiamento	Inicial		Final	
	n	(%)	n	(%)
IA	21	(25,0)	21	(25,0)
IB	11	(13,1)	10	(11,9)
IIA	15	(17,9)	13	(15,5)
IIB	10	(11,9)	8	(9,5)
IIC	7	(8,3)	3	(3,6)
IIIA	10	(11,9)	10	(11,9)
IIIB	9	(10,7)	3	(3,6)
IIIC	1	(1,2)	0	-
IV	0	-	16	(19,0)

**Tabela 4** - Número e porcentagem de pacientes segundo as variáveis histopatológicas estudadas. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

<b>Variável</b>	<b>Categoria</b>	<b>n (*)</b>	<b>(%)</b>
<b>Tipo histológico</b>	Extensivo superficial	50	(59,5)
	Nodular	7	(8,3)
	Lentigo maligno	1	(1,2)
	Acral	24	(28,6)
	Outros	2	(2,4)
<b>Nível de Clark</b>	II	12	(14,3)
	III	39	(46,4)
	IV	21	(25,0)
	V	12	(14,3)
<b>Espessura do tumor (Breslow)</b>	0-1mm	23	(27,4)
	1,01-2mm	22	(26,2)
	2,01-4mm	19	(22,6)
	>4mm	20	(23,8)
<b>Índice mitótico</b>	0	14	(16,7)
	0-6	42	(50,0)
	>6	28	(33,3)
<b>Invasão linfática</b>	Não	83	(98,8)
	Sim	1	(1,2)
<b>Invasão neural</b>	Não	79	(94,0)
	Sim	5	(6,0)
<b>Infiltração linfocitária</b>			
<b>Intratumoral</b>	Não	58	(69,9)
	Sim	25	(30,1)
<b>Peritumoral</b>	Não	10	(12,0)
	Sim	73	(88,0)
<b>Regressão</b>	Não	68	(81,0)
	Sim	16	(19,0)
<b>Ulceração</b>	Não	51	(60,7)
	Sim	33	(39,3)
<b>Microsatelitose</b>	Não	79	(94,0)
	Sim	5	(6,0)
<b>Margens</b>	Livres	65	(77,4)
	Comprometidas	18	(21,4)

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

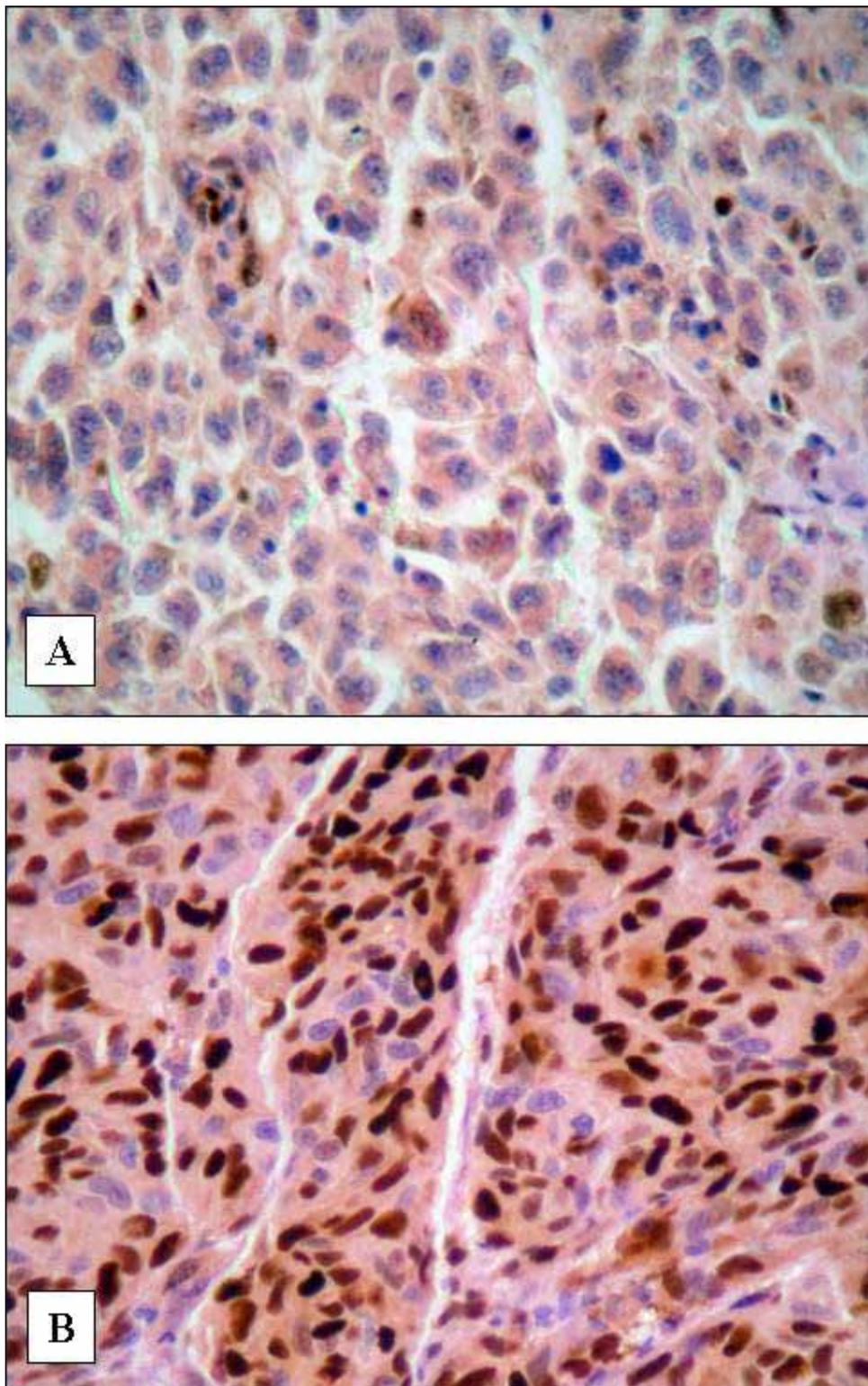
#### 4.4 EXPRESSÃO PROTÉICA POR IMUNOISTOQUÍMICA

##### Ciclina D1

Foi possível análise da expressão de ciclina D1 em todos os casos. Houve positividade em 78,6% dos casos, cuja distribuição com relação à espessura de Breslow está demonstrada na Tabela 5. A figura 4 ilustra a expressão nuclear negativa e positiva de ciclina D1 das células tumorais. Somente 25% dos nevos melanocíticos expressaram positividade para ciclina D1.

**Tabela 5** - Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de ciclina D1. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

		Ciclina D1 (negativo)		Ciclina D1 (positivo)	
		n	(%)	n	(%)
<b>Espessura do tumor (Breslow)</b>	0-1,0mm	4	(4,8)	19	(22,6)
	1,01-2,0mm	4	(4,8)	18	(21,4)
	2,01-4,0mm	3	(3,6)	16	(19)
	>4mm	7	(8,3)	13	(15,5)



**Legenda:** **A)** expressão nuclear negativa para ciclina D1 nas células de melanoma cutâneo (X400). **B)** expressão nuclear positiva para ciclina D1 nas células de melanoma cutâneo (X400).

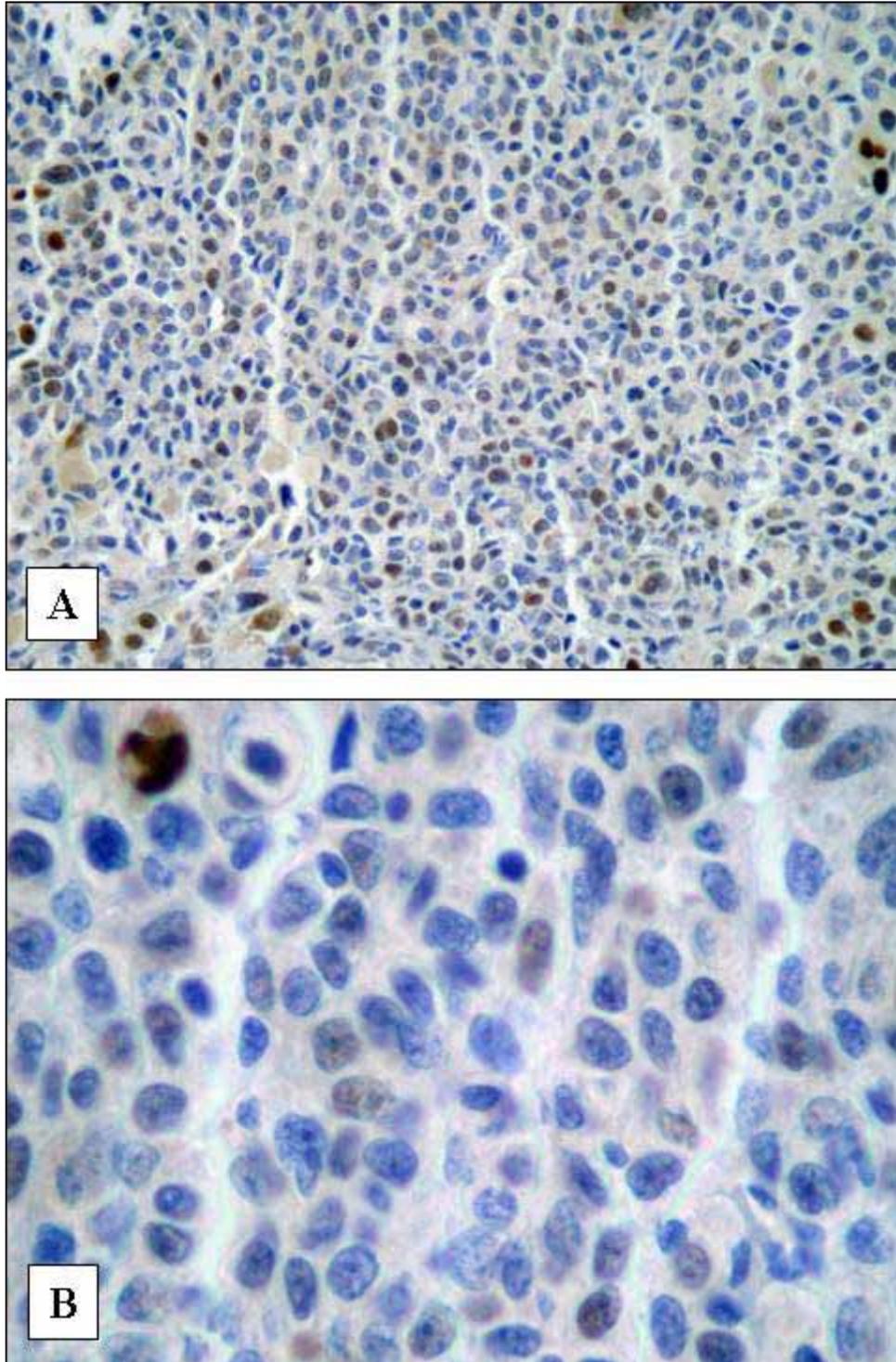
**Figura 4** - Estudo imunoistoquímico para ciclina D1 nas células de melanoma cutâneo.

### CDK4

Foi possível análise da expressão de CDK4 em todos os casos. Todos os casos apresentaram marcação citoplasmática, porém a positividade nuclear foi de 59,5% dos casos, cuja distribuição com relação à espessura de Breslow está demonstrada na Tabela 6 e ilustrada nas figuras 5 e 6. Com relação aos nevos melanocíticos a positividade citoplasmática foi moderada e marcação nuclear ocorreu em 91% dos casos, sendo mais de 50 % das células positivas em 80% destes casos.

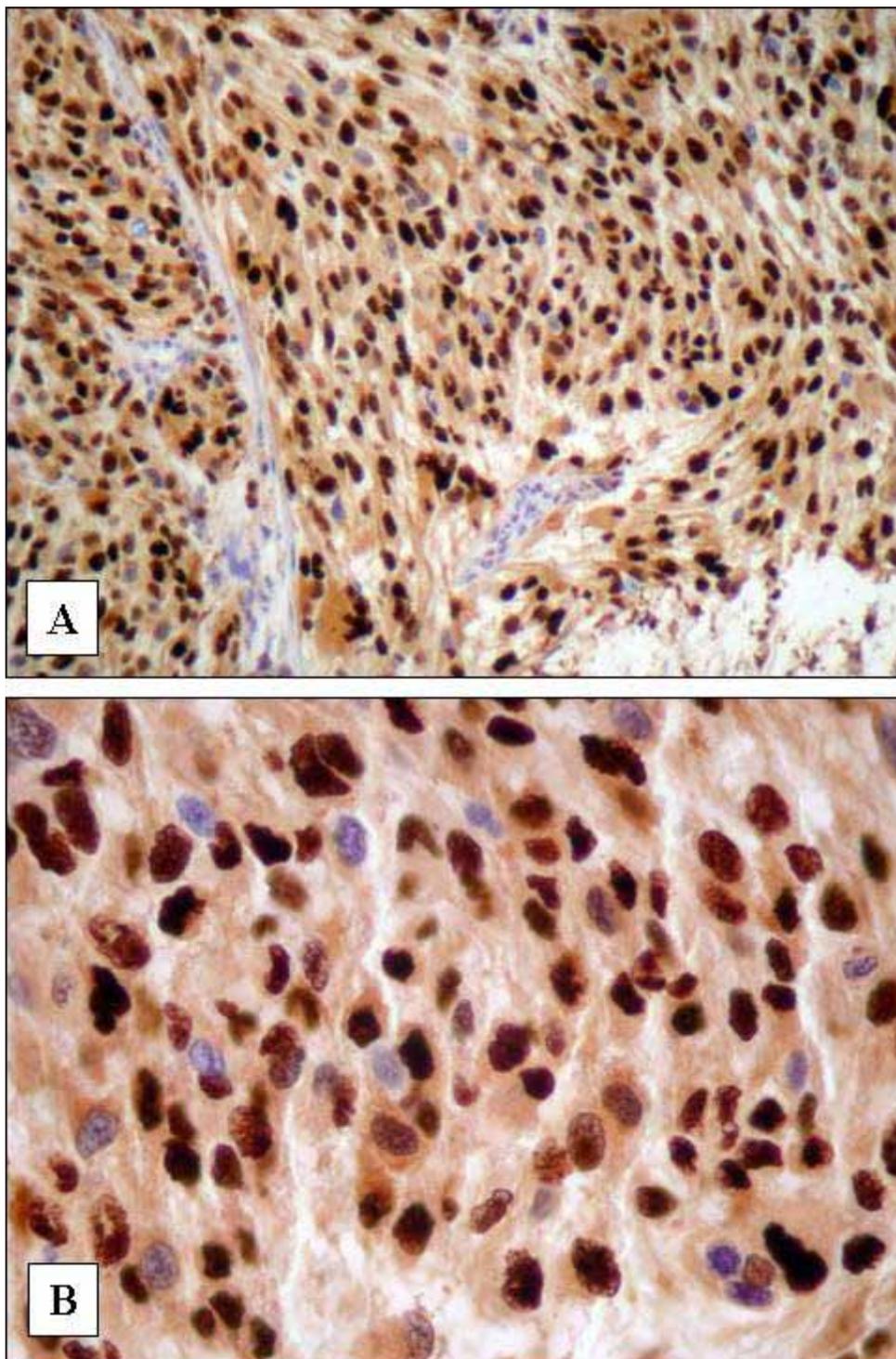
**Tabela 6** - Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de CDK4. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

		CDK4 (negativo)		CDK4 (positivo)	
		n	(%)	n	(%)
<b>Espessura do tumor (Breslow)</b>	0-1,0mm	10	(11,9)	13	(15,5)
	1,01-2,0mm	10	(11,9)	12	(14,3)
	2,01-4,0mm	8	(9,5)	11	(13,1)
	>4mm	6	(7,1)	14	(16,7)



**Legenda:** **A)** expressão nuclear positiva para cdk 4 em poucas células e expressão citoplasmática discreta (X100). **B)** detalhe das células tumorais onde se observa-se discreta marcação citoplasmática e rara marcação nuclear para cdk 4 (X400).

**Figura 5** - Estudo imunoistoquímico para cdk 4 nas células de melanoma cutâneo com expressão negativa.



**Legenda:** **A)** expressão nuclear positiva para cdk 4 na maioria das células e expressão citoplasmática positiva (X100). **B)** detalhe das células tumorais com expressão nuclear e citoplasmática para cdk 4 (X400).

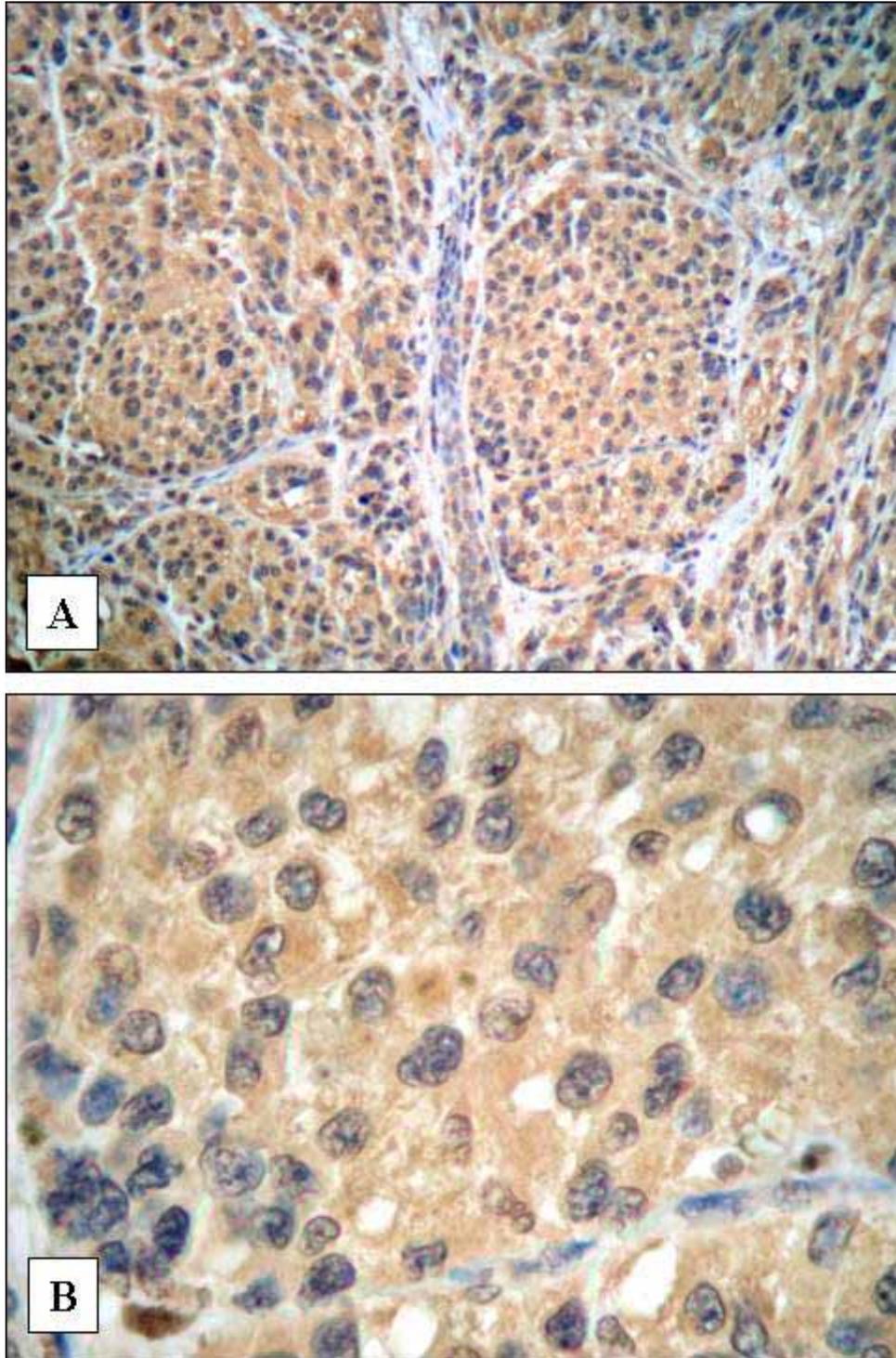
**Figura 6** - Estudo imunoistoquímico para cdk 4 nas células de melanoma cutâneo com expressão positiva.

**p16**

Foi possível análise da expressão de p16 em todos os casos. Houve positividade em 54,8% dos casos, cuja distribuição com relação à espessura de Breslow está demonstrada na Tabela 7. As figuras 7 e 8 ilustram a expressão negativa e positiva para p16 nas células tumorais. Todos os nevos melanocíticos expressaram positividade para a proteína p16 em mais de 50% das células.

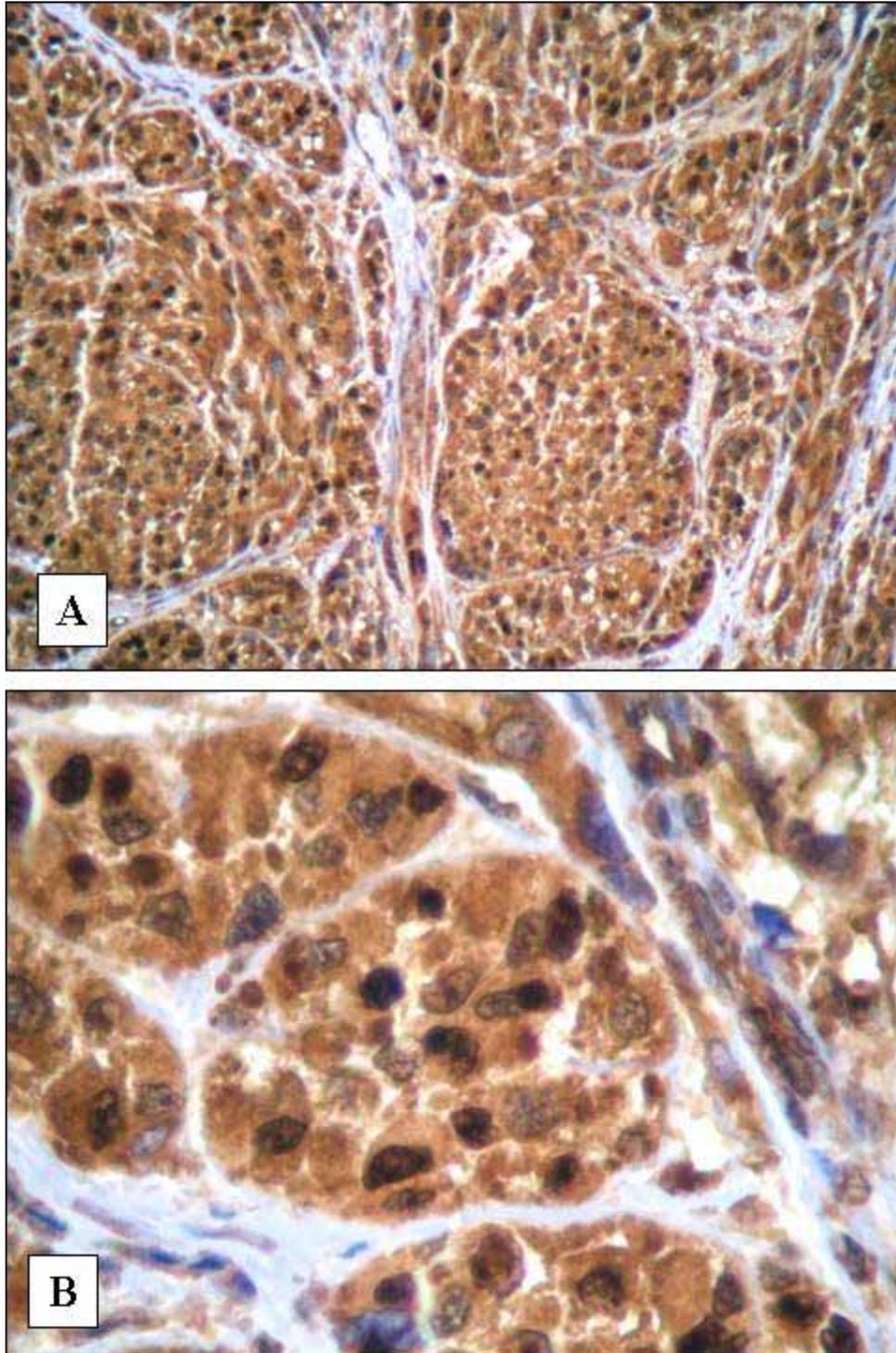
**Tabela 7** - Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de p16. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

		p16 (negativo)		p16 (positivo)	
		n	(%)	n	(%)
<b>Espessura do tumor (Breslow)</b>	0-1,0mm	12	(14,3)	11	(13,1)
	1,01-2,0mm	7	(8,3)	15	(17,9)
	2,01-4,0mm	8	(9,5)	11	(13,1)
	>4mm	11	(13,1)	9	(10,7)



**Legenda:** A) expressão nuclear negativa para p16 nas células tumorais (X100). B) detalhe das células tumorais sem expressão (nuclear) para p16 (X400).  
A pigmentação castanha que se observa no citoplasma das células tumorais foi considerada pelo autor como artefato da técnica (fundo).

**Figura 7** - Estudo imunoistoquímico para p16 nas células de melanoma cutâneo com expressão negativa.



**Legenda:** A) expressão nuclear positiva para p16 nas células tumorais (X100). B) detalhe das células tumorais com expressão nuclear para p16 (X400). A pigmentação castanha que se observa no citoplasma das células tumorais foi considerada pelo autor como artefato da técnica (fundo).

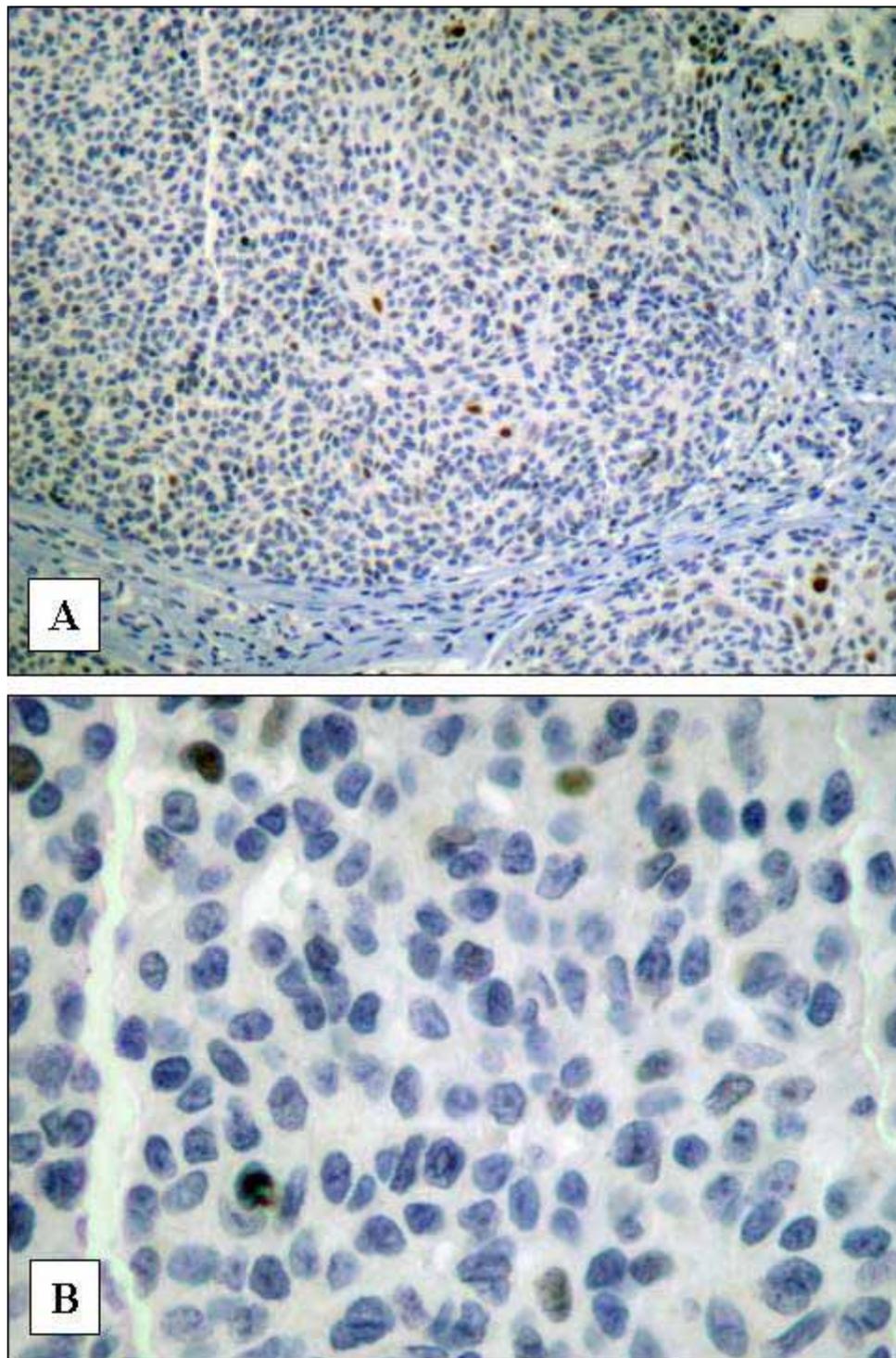
**Figura 8** - Estudo imunoistoquímico para p16 nas células de melanoma cutâneo com expressão positiva.

**p21**

Foi possível análise da expressão de p21 em todos os casos. Houve positividade em 26,2% dos casos, cuja distribuição com relação à espessura de Breslow está demonstrada na Tabela 8. As figuras 9 e 10 ilustram a expressão negativa e positiva para p16 nas células tumorais. Nenhum dos nevos melanocíticos apresentou marcação positiva nuclear.

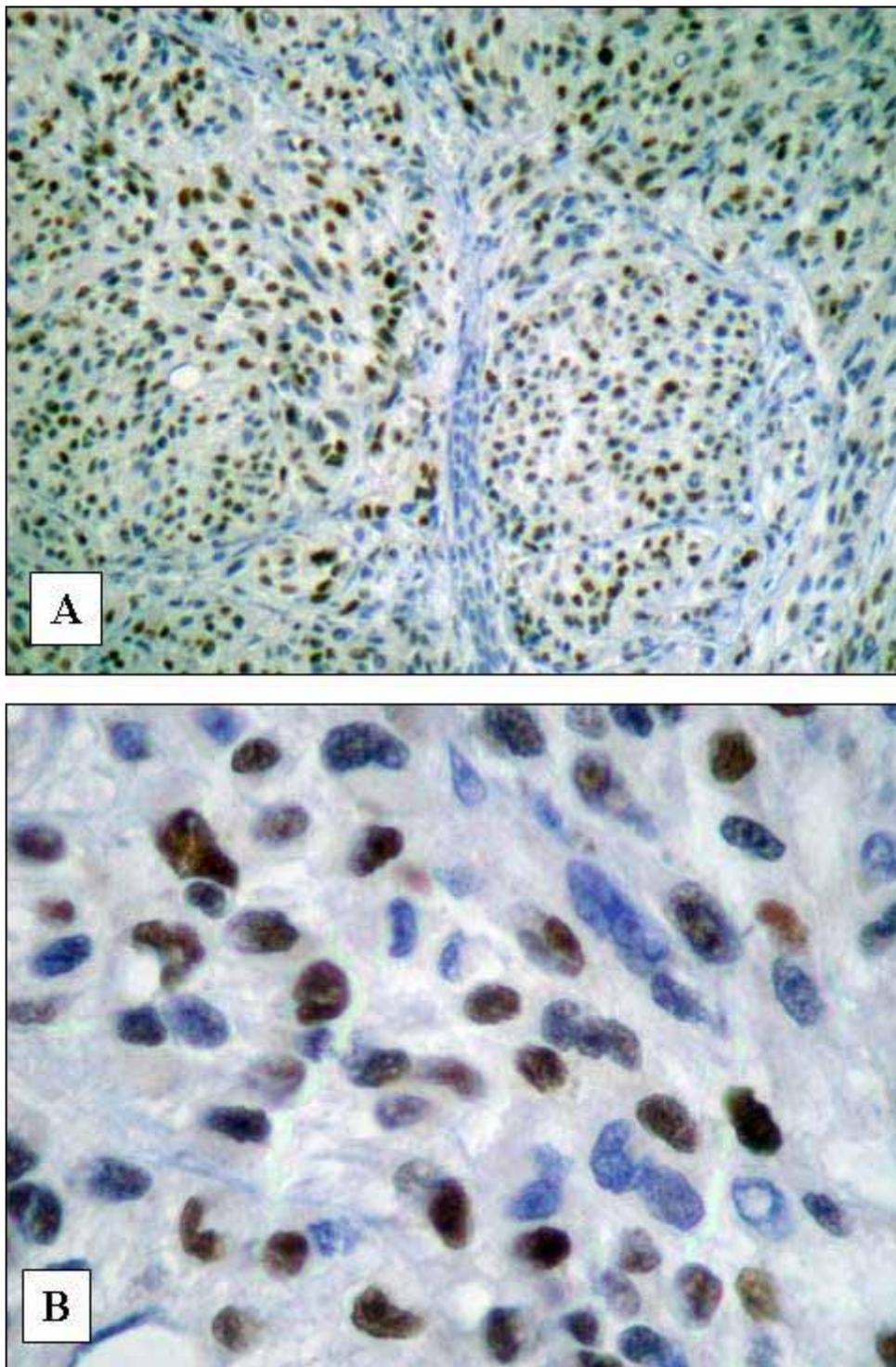
**Tabela 8** - Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de p21. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

		p21 (negativo)		p21 (positivo)	
		n	(%)	n	(%)
<b>Espessura do tumor (Breslow)</b>	0-1,0mm	16	19,0	7	8,3
	1,01-2,0mm	19	22,6	3	3,6
	2,01-4,0mm	13	15,5	6	7,1
	>4mm	14	16,7	6	7,1



**Legenda:** A) expressão nuclear negativa para p21 nas células tumorais (X100). B) detalhe das células tumorais sem expressão (nuclear) para p21 (X400).

**Figura 9** - Estudo imunoistoquímico para p21 nas células de melanoma cutâneo com expressão negativa.



**Legenda:** **A)** expressão nuclear positiva para p21 nas células tumorais (X100). **B)** detalhe das células tumorais com expressão nuclear para p16 (X400).

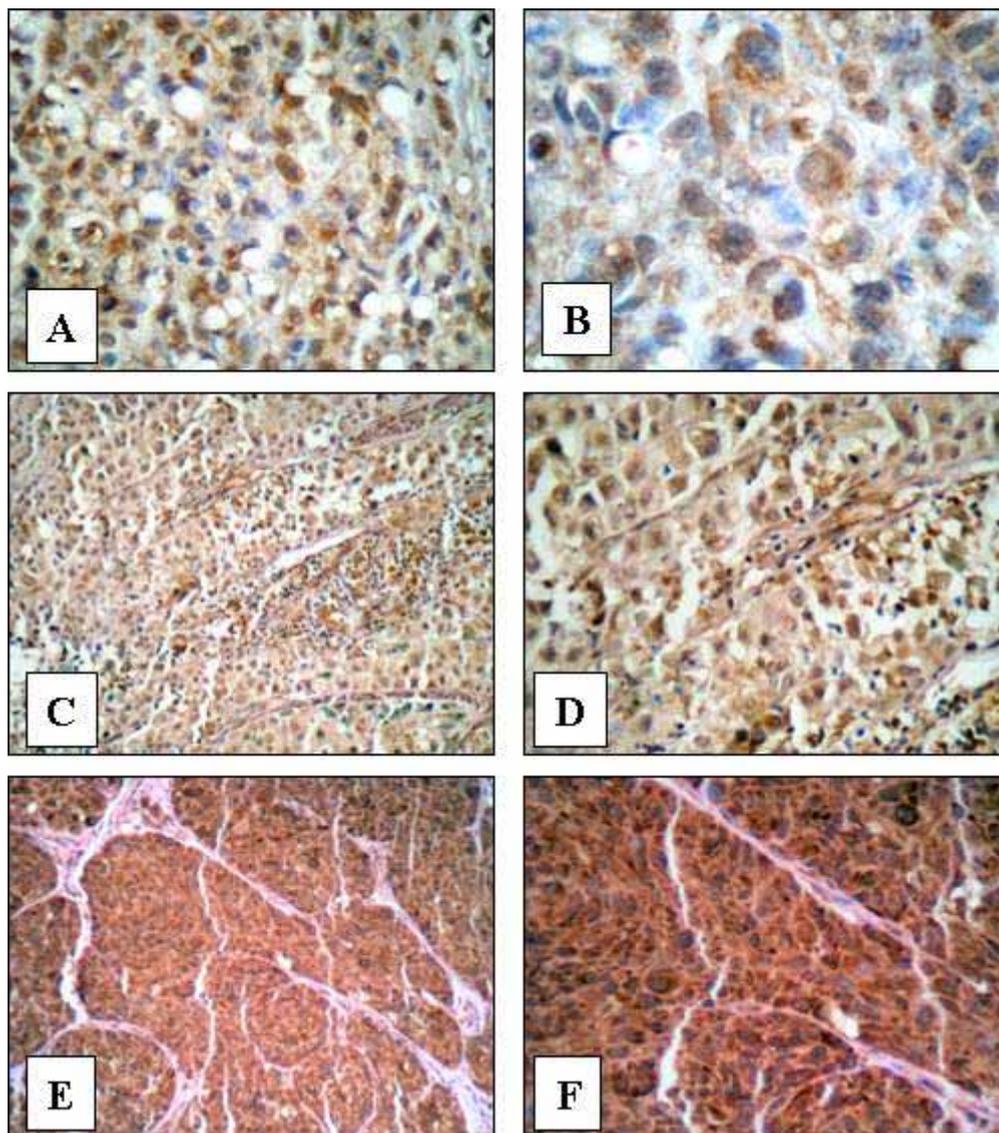
**Figura 10** - Estudo imunoistoquímico para p21 nas células de melanoma cutâneo com expressão positiva.

## MMP-2

Foi possível análise da expressão de MMP-2 em todos os casos. Foram negativos apenas 6 casos (7,1%) e os demais apresentaram positividade variada conforme a distribuição demonstrada com relação à espessura de Breslow está demonstrada na Tabela 9 e ilustrada na figura 11. Um quarto dos nevos melanocíticos foram negativos para MMP-2. Os demais apresentaram positividade leve (33%), moderada (45%) e intensa (22%).

**Tabela 9** - Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de MMP-2. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

		MMP-2							
		Negativo		Leve		Moderado		Intenso	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<b>Espessura do tumor (Breslow)</b>	0-1,0mm	3	(3,6)	8	(9,5)	5	(6,0)	7	(8,3)
	1,01-2,0mm	1	(1,2)	8	(9,5)	9	(10,7)	4	(4,8)
	2,01-4,0mm	1	(1,2)	4	(4,8)	5	(6,0)	9	(10,7)
	>4mm	1	(1,2)	4	(4,8)	6	(7,1)	9	(10,7)



**Legenda:** **A)** expressão citoplasmática de intensidade leve para MMP-2 nas células tumorais (X100). **B)** detalhe das células tumorais com expressão citoplasmática leve (X400). **C)** expressão citoplasmática de intensidade moderada para MMP-2 nas células tumorais (X100). **D)** detalhe das células tumorais com expressão citoplasmática moderada (X400). **E)** expressão citoplasmática intensa para MMP-2 nas células tumorais (X100). **F)** detalhe das células tumorais com expressão citoplasmática intensa (X400).

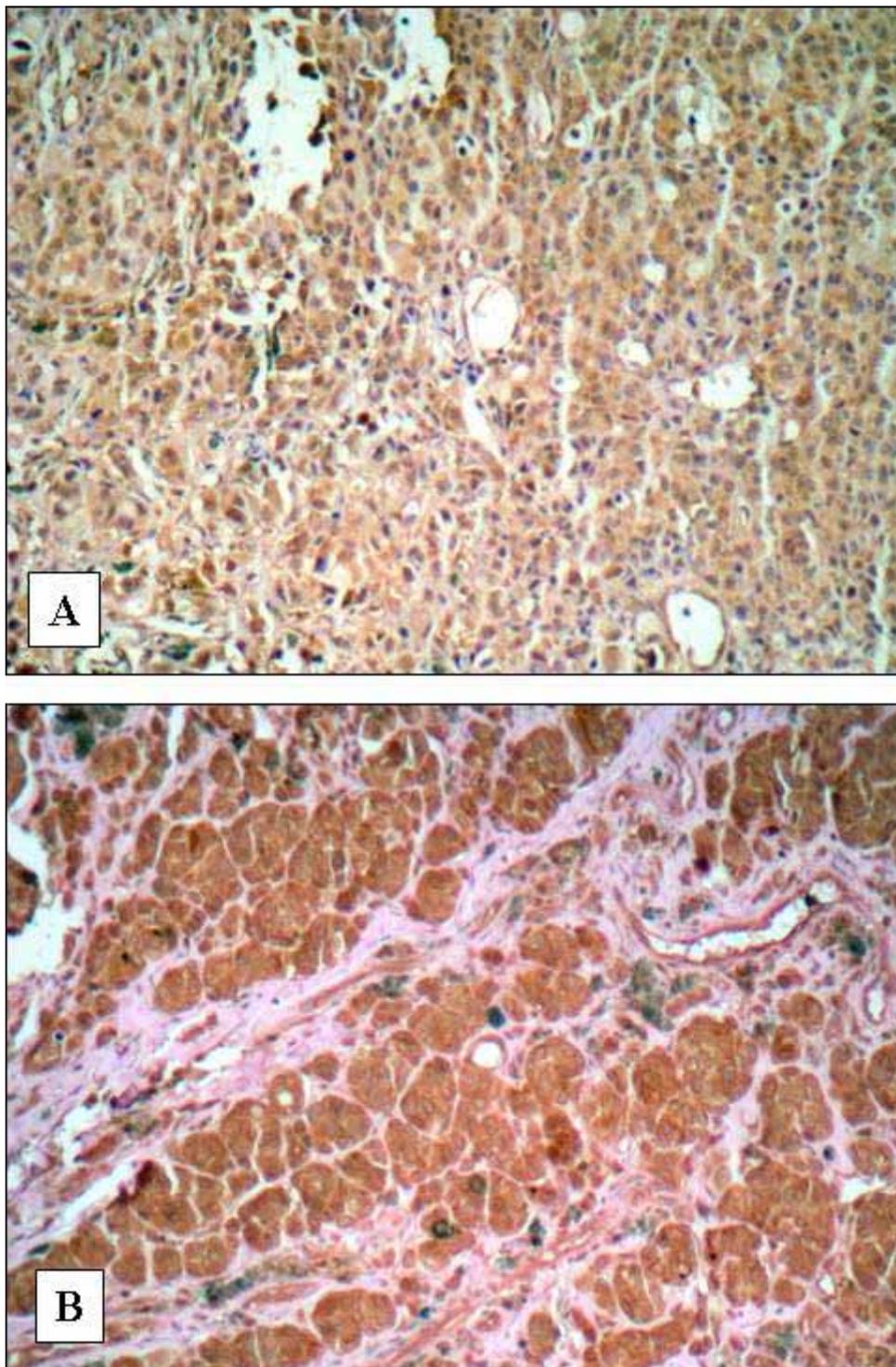
**Figura 11** – Variação da expressão citoplasmática de MMP-2 nas células de melanoma cutâneo por estudo imunoistoquímico.

### MMP-9

Foi possível análise da expressão de MMP-9 em todos os casos. Foram negativos apenas 3 casos (3,6%) e os demais apresentaram positividade variada conforme a distribuição demonstrada com relação à espessura de Breslow está demonstrada na Tabela 10 e ilustrada na figura 12. Dos nevos melanocíticos 16% foram negativos para MMP-9. Os demais apresentaram positividade leve (10%), moderada (60%) e intensa (30%).

**Tabela 10** - Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de MMP-9. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

		MMP-9							
		Negativo		Leve		Moderado		Intenso	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<b>Espessura do tumor (Breslow)</b>	0-1,0mm	1	(1,2)	5	(6,0)	9	(10,7)	8	(9,5)
	1,01-2,0mm	0	(0,0)	8	(9,5)	6	(7,1)	8	(9,5)
	2,01-4,0mm	1	(1,2)	1	(1,2)	8	(9,5)	9	(10,7)
	>4mm	1	(1,2)	3	(3,6)	10	(11,9)	6	(7,1)



**Legenda:** **A)** expressão citoplasmática de intensidade moderada para MMP-9 nas células tumorais (X100). **B)** expressão citoplasmática intensa para MMP-9 nas células tumorais (X100).

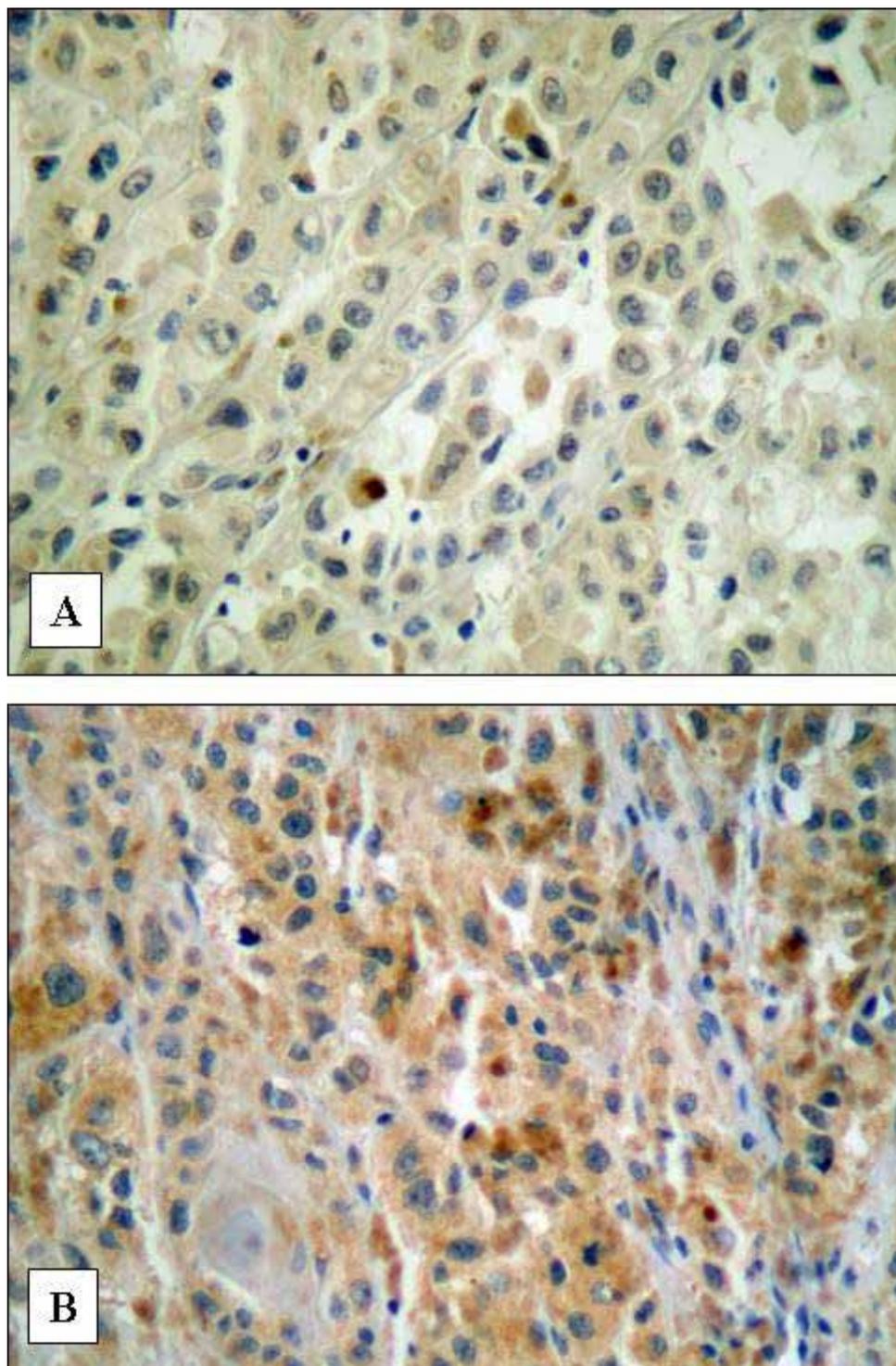
**Figura 12** - Estudo imunoistoquímico para MMP-9 nas células de melanoma cutâneo com expressão variada.

**$\alpha\upsilon\beta 3$** 

Foi possível a análise da expressão de  $\alpha\upsilon\beta 3$  em todos os casos. Quando positiva a marcação ocorreu em mais de 75% das células tumorais. Foram negativos 15 casos (17,9%) e os demais apresentaram positividade variada conforme a espessura de Breslow que está demonstrada na Tabela 11 e ilustrada na figura 13. Dos nevos melanocíticos somente 3 casos (25%) apresentaram positividade fraca, os demais foram negativos para  $\alpha\upsilon\beta 3$ .

**Tabela 11** - Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de  $\alpha\upsilon\beta 3$ . (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

		<b><math>\alpha\upsilon\beta 3</math></b>							
		<b>Negativo</b>		<b>Leve</b>		<b>Moderado</b>		<b>Intenso</b>	
		<b>n</b>	<b>(%)</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
<b>Espessura do tumor (Breslow)</b>	0-1,0mm	5	(6,0)	9	(10,7)	4	(4,8)	5	(6,0)
	1,01-2,0mm	3	(3,6)	11	(13,1)	5	(8,3)	1	(1,2)
	2,01-4,0mm	4	(4,8)	5	(6,0)	7	(8,3)	3	(3,6)
	>4mm	3	(3,6)	6	(7,1)	10	(11,9)	1	(1,2)



**Legenda:** A) expressão nuclear negativa para integrina  $\alpha\beta 3$  nas células de melanoma cutâneo (X400). B) expressão citoplasmática positiva para integrina  $\alpha\beta 3$  em mais de 50% das células de melanoma cutâneo (X400).

**Figura 13** - Estudo imunoistoquímico para integrina  $\alpha\beta 3$  nas células de melanoma cutâneo.

## **Variáveis associadas à presença de micrometástase de melanoma em linfonodo sentinela**

### **1. Análise univariada**

Nenhuma variável sociodemográfica mostrou associação estatisticamente significativa com a presença de micrometástase no linfonodo sentinela (Tabela 12).

Das variáveis histopatológicas, a espessura do tumor (Breslow –  $p=0,001$ ), o nível de Clark ( $p=0,010$ ) e a invasão perineural ( $p=0,011$ ) mostrou associação estatisticamente significativa com as micrometástases no linfonodo sentinela. Pela tendência a significância, microsatelitose ( $p=0,085$ ), regressão ( $p=0,102$ ) e localização do tumor ( $p=0,106$ ), foram selecionados para a regressão logística (Tabela 13).

Das variáveis moleculares somente a ausência de expressão de ciclina D1 apresentou associação estatisticamente significativa com as micrometástases no linfonodo sentinela (Tabela 14). Pelo seu nível de significância a expressão de CDK4 ( $p=0,130$  – Tabela 15) foi selecionada para a regressão logística. As demais variáveis não apresentaram associação estatisticamente significativa com metástases no linfonodo sentinela (Tabelas 16, 17, 18, 19 e 20).

**Tabela 12** - Número e porcentagem de pacientes segundo o status para micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e as variáveis demográficas e clínicas estudadas. (Hospital do Câncer AC Camargo - 1998-2004).

Variável	Categoria	LNS (+)		LNS (-)		p
		N (*)	(%)	n (*)	(%)	
<b>sexo</b>	Feminino	9	(10,7)	36	(42,9)	0,379 <sup>(a)</sup>
	Masculino	11	(13,1)	28	(33,3)	
<b>Idade</b>	< 50 anos	9	(10,7)	27	(32,1)	0,824 <sup>(a)</sup>
	≥ 50 anos	11	(13,1)	37	(44,0)	
<b>Localização do tumor</b>	Cabeça e pescoço	0	(0,0)	1	(1,2)	0,106 <sup>(a)</sup>
	Membros	17	(20,2)	38	(45,2)	
	Tronco	3	(3,6)	25	(29,8)	

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

**Tabela 13** - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e as variáveis histopatológicas estudadas. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

Variável	Categoria	LNS (+)		LNS (-)		P	
		n (*)	(%)	n (*)	(%)		
Tipo histológico	Extensivo superficial	8	(9,5)	42	(50,0)	0,140 <sup>(a)</sup>	
	Nodular	2	(2,4)	5	(6,0)		
	Lentigo maligno	0	(0)	1	(1,2)		
	Acral	10	(11,9)	14	(16,7)		
	Outros	0	(0)	2	(2,4)		
Nível de Clark	II	1	(1,2)	11	(13,1)	0,010 <sup>(a)</sup>	
	III	6	(7,1)	33	(39,3)		
	IV	6	(7,1)	15	(17,9)		
	V	7	(8,3)	5	(6,0)		
Espessura do tumor (Breslow)	0-1mm	2	(2,4)	21	(25,0)	0,001 <sup>(a)</sup>	
	1,01-2mm	4	(4,8)	18	(21,4)		
	2,01-4mm	3	(3,6)	16	(19,0)		
	>4mm	11	(13,1)	9	(10,7)		
Índice mitótico	0	1	(1,2)	13	(15,5)	0,269 <sup>(a)</sup>	
	0-6	11	(13,1)	31	(36,9)		
	>6	8	(9,5)	20	(23,8)		
Invasão linfática	Não	19	(22,6)	64	(76,2)	0,238 <sup>(b)</sup>	
	Sim	1	(1,2)	0	(0)		
Invasão neural	Não	16	(19,0)	63	(75,0)	0,011 <sup>(b)</sup>	
	Sim	4	(4,8)	1	(1,2)		
Infiltração linfocitária	Intratumoral	Não	16	(19,3)	42	(50,6)	0,257 <sup>(a)</sup>
		Sim	4	(4,8)	21	(25,3)	
	Peritumoral	Não	2	(2,4)	8	(9,6)	1,00 <sup>(b)</sup>
		Sim	18	(21,7)	55	(66,3)	
Regressão	Não	19	(22,6)	49	(58,3)	0,102 <sup>(b)</sup>	
	Sim	1	(1,2)	15	(17,9)		
Ulceração	Não	10	(11,9)	41	(48,8)	0,261 <sup>(a)</sup>	
	Sim	10	(11,9)	23	(27,4)		
Microsatelitose	Não	17	(20,2)	62	(73,8)	0,085 <sup>(b)</sup>	
	Sim	3	(3,6)	2	(2,4)		
Margens	Livres	17	(20,2)	48	(57,1)	0,602 <sup>(a)</sup>	
	comprometidas	3	(3,6)	15	(17,9)		

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

(b) Teste exato de Fisher

**Tabela 14** - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de ciclina D1. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

		LNS positivo		LNS negativo		p
		n(*)	(%)	n(*)	(%)	
<b>Ciclina D1</b>	<b>Negativo</b>	9	10,7	9	10,7	0,003 <sup>(a)</sup>
	<b>Positivo</b>	11	13,1	55	65,5	

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

**Tabela 15** - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de CDK4. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

		LNS positivo		LNS negativo		p
		n(*)	(%)	n(*)	(%)	
<b>CDK4</b>	<b>Negativo</b>	11	(13,1)	23	(27,4)	0,130 <sup>(a)</sup>
	<b>Positivo</b>	9	(10,7)	41	(48,8)	

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

**Tabela 16** - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de p16. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

		LNS positivo		LNS negativo		p
		n(*)	(%)	n(*)	(%)	
<b>p16</b>	<b>Negativo</b>	10	(11,9)	28	(33,3)	0,624 <sup>(a)</sup>
	<b>Positivo</b>	10	(11,9)	36	(42,9)	

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

**Tabela 17** - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de p21. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

		LNS positivo		LNS negativo		p
		n(*)	(%)	n(*)	(%)	
<b>p21</b>	<b>Negativo</b>	15	17,9	47	56,0	0,890 <sup>(a)</sup>
	<b>Positivo</b>	5	6,0	17	20,2	

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

**Tabela18** - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de MMP-2. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

		LNS positivo		LNS negativo		p
		n(*)	(%)	n(*)	(%)	
<b>MMP-2</b>	<b>Negativo</b>	1	(1,2)	5	(6,0)	0,900 <sup>(a)</sup>
	<b>Leve</b>	6	(7,1)	18	(21,4)	
	<b>Moderado</b>	7	(8,3)	18	(21,4)	
	<b>Intenso</b>	6	(7,1)	23	(27,4)	

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

**Tabela 19** - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de MMP-9. (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

		LNS positivo		LNS negativo		p
		n(*)	(%)	n(*)	(%)	
<b>MMP-9</b>	<b>Negativo</b>	1	(1,2)	2	(2,4)	0,853 <sup>(a)</sup>
	<b>Leve</b>	5	(6,0)	12	(14,3)	
	<b>Moderado</b>	8	(9,5)	25	(29,8)	
	<b>Intenso</b>	6	(7,1)	25	(29,8)	

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

**Tabela 20** - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de  $\alpha\upsilon\beta 3$ . (Hospital do Câncer AC Camargo.1998-2004).

		LNS positivo		LNS negativo		p
		n(*)	(%)	n(*)	(%)	
<b><math>\alpha\upsilon\beta 3</math></b>	<b>Negativo</b>	3	(3,6)	12	(14,3)	0,513 <sup>(a)</sup>
	<b>Leve</b>	7	(8,3)	24	(28,6)	
	<b>Moderado</b>	9	(10,7)	19	(22,6)	
	<b>Intenso</b>	1	(1,2)	9	(10,7)	

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

## 2 Regressão logística múltipla

As variáveis selecionadas para a regressão logística múltipla bem como a ordem de entrada das mesmas no modelo estão na Tabela 21.

No modelo final, as seguintes variáveis independentes mostraram-se associadas à presença de metástase no linfonodo sentinela: espessura do tumor

(Breslow – OR=0,011; IC95%:1,7-63,7), invasão neural (OR=0,013; IC95%:1,9-318,9) e negatividade para ciclina D1 (OR=0,010; IC95%: 1,5-22,8). (Tabela 22).

**Tabela 21** - Modelo final para regressão logística múltipla das variáveis selecionadas na análise univariada associadas à metástase no linfonodo sentinela.

TIPO DE VARIÁVEL	VARIÁVEL	p	ORDEM DE ENTRADA NO MODELO
<b>Variável clínica</b>	Localização do tumor	0,106	7°
	Nível de Clark	0,010	2°
	Espessura do tumor (Breslow)	0,001	1°
<b>Variáveis histopatológicas</b>	Invasão neural	0,011	4°
	Regressão	0,102	6°
	Microsatelitose	0,085	5°
<b>Variáveis moleculares</b>	Ciclina D1	0,010	3°
	CDK4	0,130	8°

**Tabela 22** - Descrição das etapas da regressão logística múltipla para a identificação das variáveis associadas às metástases nos linfonodos pélvicos.

ETAPA	VARIÁVEIS	CATEGORIA	p	OR	IC95% (OR)	MODELAGEM
<b>1</b>	Espessura do tumor (Breslow)	0-1,0mm	0,008	-	-	-
		1,01- 4,0mm	0,617	1,58	0,2 – 9,5	Mantida
		> 4mm	0,011	10,40	1,7 – 63,7	Mantida
<b>2</b>	Invasão neural	Positiva	0,013	25,15	1,9 – 318,9	Mantida
<b>3</b>	Ciclina D1	Negativo	0,010	5,8	1,5 – 22,1	mantida

OR: Odds ratio      IC95%: Intervalo de confiança de 95%

## 5 DISCUSSÃO

O melanoma cutâneo é uma neoplasia de incidência crescente, enigmática e potencialmente letal.

O grande desafio clínico está na detecção e excisão precoce do melanoma, pois se sabe que o mais importante indicador prognóstico continua sendo a espessura do tumor. Porém, nos casos de tumores mais espessos, a busca de fatores para a definição do estadiamento, do prognóstico e da melhora da sobrevida tem motivado diversos estudos sobre o assunto.

O Hospital do Câncer A C Camargo de São Paulo é considerado centro de referência no tratamento de câncer buscando constantemente o aprimoramento técnico e científico de suas equipes incentivando inúmeros pesquisadores a desenvolver estudos científicos em diversas áreas.

A complexidade da gênese dos tumores envolve não somente o fenótipo do indivíduo e o ambiente em que vive, expondo-se constantemente a diversos tipos de agressões, mas também o genótipo proporcionando inúmeras combinações de fatores.

A busca constante da compreensão das alterações que ocorrem no interior das células, bem como sua correlação com as outras células, o microambiente em que vive, a nutrição vascular, a vigilância imunológica, a resposta terapêutica, entre outras, torna fascinante e interminável este campo de pesquisa.

A possibilidade de analisar tumores primários de melanoma cutâneo e verificar a expressão de proteínas que modulam o ciclo celular e parte da adesão

celular comparando esta expressão com relação à influência no desenvolvimento de metástases linfáticas motivou a realização deste estudo.

Tissue microarray permite estudar o perfil molecular de diversos espécimes de tecidos por diferentes técnicas, inclusive, imunoistoquímica (HOOS et al. 2001). No presente estudo foi confeccionado um bloco de TMA com 84 amostras de melanoma primário em duplicata e 12 amostras de nevo melanocítico intradérmico. Para tumores com espessura menor de 1mm optou-se pela utilização de lâminas convencionais.

MORTON et al. (1992) provaram que o primeiro linfonodo de drenagem de determinado segmento corpóreo, linfonodo sentinela, poderia prever o estado dos linfonodos regionais com 99% de acurácia. Portanto, estudando a população de pacientes submetidos à pesquisa sistemática de metástases em linfonodo sentinela foi obtido dois grupos distintos.

Dois grupos de proteínas estão fortemente envolvidos na progressão do ciclo celular. São eles: as ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas (cdk). Dentre todas as proteínas destes grupos foi escolhida a proteína ciclina D1 e CDK4, pois juntas formam o complexo que fosforila a proteína do retinoblastoma (pRb), liberando o fator E2F, responsável pela progressão do ciclo celular para a fase de síntese (S). Especula-se que o estudo de outras proteínas envolvidas na modulação do ciclo celular como ciclina E cdk2, talvez fosse bastante interessante para este grupo de pacientes estudados, como veremos adiante.

O controle regulatório por inibição da cdk pode ser realizado por várias proteínas, entre elas, a proteína p21 e p16, escolhidas para o presente estudo.

Com relação à adesão celular TRIKHA et al. (2002) ram aumento na expressão de integrina  $\alpha\beta3$  em melanomas, bem como em suas metástases. Portanto, com objetivo de avaliar se a expressão desta proteína pode estar relacionada ao desenvolvimento de metástase nodais precoces, foi incluída no estudo.

Como a capacidade de invasão dérmica parece ser um evento que antecede a capacidade de produzir metástase no melanoma. O estudo de proteínas que degradam a matriz extracelular pode ser no mínimo interessante. As metaloproteinases 2 e 9 (gelatinases) foram escolhidas dentre outras para fazer parte do estudo.

Sendo assim foram escolhidas para o presente estudo as proteínas ciclina D1 e cdk4, p21 e p16, integrina  $\alpha\beta3$  e MMP-2 e MMP-9, cujos resultados serão discutidos a seguir.

O presente estudo é de coorte retrospectivo, realizado com pacientes portadores de melanoma cutâneo. Estes pacientes procuraram o Serviço de Oncologia Cutânea do Hospital A C Camargo ou foram encaminhados, muitas vezes com o diagnóstico e estadiamento clínico inicial, para seqüência de tratamento no período de 1998 a 2003. Todos os pacientes do estudo foram submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela e o exame anatomopatológico do linfonodo foi realizado no Departamento de Anatomia Patológica da Instituição. Isso permitiu total acesso às informações constantes nos prontuários médicos arquivados no SAME, aos laudos, lâminas e blocos de parafina arquivados no Departamento de Anatomia Patológica, além dos profissionais envolvidos nas diversas etapas do acompanhamento dos pacientes. Por outro lado, a participação de outros centros de pesquisa e/ou de

tratamento do Melanoma Cutâneo, poderia ter contribuído para aumento do número de casos estudados.

As informações demográficas e clínicas foram obtidas através da análise dos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico-SAME. Vale ressaltar que este Serviço dispõe de funcionários competentes e atenciosos e que todos os prontuários foram obtidos sem qualquer dificuldade, pois o funcionamento do mesmo é integral e ininterrupto.

Os prontuários da instituição foram elaborados para que se disponha da anamnese completa do paciente. A folha de admissão é padronizada onde são preenchidos os campos de identificação, queixa e duração, antecedentes pessoais e familiares, fatores relacionados ao câncer, investigação sobre diversos aparelhos, exame clínico geral e topográfico, informações complementares e hipóteses diagnósticas. A seqüência de informações é arquivada cronologicamente sendo, na última página, encontradas informações mais recentes. Nos anexos, estão arquivados cronologicamente os laudos de exames (anatomopatológico, imagem, laboratório, relatórios de cirurgia, controle de dose de quimioterapia e radioterapia, entre outros). Periodicamente os prontuários são revistos por uma comissão que avalia a qualidade no preenchimento destes dados e solicita à equipe responsável complementação quando julgar necessária. Com isso o Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A. C. Camargo possui prontuários de excelente qualidade e informações de seus pacientes sendo que sua trajetória pode ser prontamente compreendida desde o primeiro ao último dia em que esteve no hospital. O preenchimento da ficha de admissão e da evolução clínica depende exclusivamente do médico que assiste ao paciente e, portanto, falhas na obtenção de informações podem ocorrer quando se

analisam prontuários em que diversos médicos, de diversas especialidades, transcrevem suas observações. As informações demográficas e clínicas pertinentes ao presente estudo foram obtidas com êxito.

Foram revisados sistematicamente 270 prontuários correspondendo a todos os pacientes submetidos à pesquisa de Linfonodo sentinela (LNS) no período de 1998 a 2003 que passa a ser designada de “população geral”. O objetivo desta primeira análise foi descrever, de forma geral, a população estudada. Além disso, a análise do prontuário permitiu localizar o exame anatomopatológico inicial (melanoma primário) quando este fora realizado utilizando-se o número de atendimento.

Por se tratar de hospital de referência em tratamento de câncer, quase metade dos pacientes submetidos à ampliação das margens cirúrgicas e LNS foram encaminhados de outros serviços, cuja revisão diagnóstica fora realizada somente com os cortes histológicos em lâminas de vidro, não dispondo de blocos de parafina.

Parte dos blocos de parafina levantados do arquivo de blocos do Departamento de Anatomia Patológica não dispunha de material suficiente para inclusão no TMA. Àqueles em que o material era escasso, melanomas finos, lâminas com cortes convencionais foram realizadas. O presente estudo analisou 84 casos de melanoma primários de pacientes que foram submetidos à LNS.

Na “população geral” (270 casos) a idade média ao diagnóstico foi de 52 anos (mediana 51 anos), mais da metade com idade acima de 50 anos (54%) com predomínio do sexo feminino (54%). No grupo estudado (84 casos) a idade média ao diagnóstico foi de 53 anos (mediana 52 anos), mais da metade com idade acima de 50 anos (53%) com predomínio do sexo feminino (53%). Portanto, a amostra

estudada apresenta o perfil demográfico semelhante à “população geral” da qual foi derivada.

Neste estudo, 12 variáveis histopatológicas relativas ao tumor foram revistas garantindo uniformidade nas informações. Durante a revisão foram assinalados os pontos para punção do bloco de parafina para a confecção do bloco de TMA.

Houve predomínio do tipo extensivo superficial (59,5%), seguido do tipo acral (28,6%) e nodular (8,3%). Houve apenas um caso de lentigo maligno melanoma e dois casos classificados como outros tipos (melanoma nevíde e melanoma padrão verrucoso). Embora se saiba que a fase *in situ* do melanoma tenha períodos variáveis de evolução para a fase infiltrativa e que alguns tipos histológicos apresentam comportamento biológico mais agressivo (nodular) a classificação histológica permite não somente a avaliação epidemiológica, mas possibilita estudos de correlação para melhor entendimento destes tumores. Neste estudo, ressalta-se que os pacientes com tumores classificados como outros tipos e o de lentigo maligno melanoma apresentaram LNS negativo para micrometástases e encontravam-se vivos até outubro de 2005, porém no caso do tipo nevíde com metástase em coluna vertebral.

Houve predomínio da fase vertical de crescimento (95,2%) nos melanomas estudados. Esta observação já era esperada, pois a pesquisa de micrometástase em linfonodo sentinela é indicada para casos em que a espessura tumoral atinja ou ultrapasse de 0,76mm. Somente quatro casos apresentavam crescimento radial. Dois deles eram do tipo acral e a ampliação de margens após o diagnóstico inicial foi à amputação do pododáctilo com a linfadenectomia seletiva no mesmo tempo cirúrgico. Os demais apresentaram laudo externo com espessura de Breslow de

0,76mm e outro Melanoma Clark II com área de regressão que faz com que a pesquisa de micrometástase em linfonodo sentinela seja realizada.

Segundo a versão final do estadiamento do melanoma cutâneo elaborada pela *American Joint Committee on cancer* (AJCC) o Nível de Clark continua sendo considerado relevante embora venha sendo gradativamente abandonado e substituído pela espessura segundo Breslow (BALCH et al. 2001). Ressalta-se que o nível de Clark está vinculado a grande número de protocolos de pesquisa e é uma informação histológica classicamente conhecida. Sabe-se que, quando a espessura é maior do que 1mm existe correlação positiva com pior prognóstico (BALCH et al. 2001). No presente estudo, quando se avalia isoladamente o nível de Clark, observa-se relação estatisticamente significativa entre o nível de Clark maior e a presença de metástase em linfonodo sentinela ( $p=0,01$ ). Porém na análise multivariada não apresentou poder estatístico maior do que a espessura do tumor segundo de Breslow.

A espessura expressa em milímetros determinada a partir da camada granulosa até a célula neoplásica mais profunda do tumor é definida como espessura de Breslow. Este parâmetro é o de maior impacto na determinação da sobrevida global em cinco anos e, portanto, é considerado o fator prognóstico isolado mais importante nos pacientes com melanoma localizado (BRESLOW 1970; BALCH et al. 2001).

No presente estudo a espessura de Breslow apresentou relação estatisticamente significativa com presença de metástase em linfonodo sentinela tanto na análise univariada quanto na multivariada. Estes resultados concordam com os achados da literatura, citados acima. Esta variável foi utilizada como parâmetro

geral para apresentar os resultados obtidos da análise das reações de imunohistoquímica das proteínas que foram propostas e descritas anteriormente.

A análise estatística das variáveis histológicas revelou que a invasão perineural, conhecida como fator prognóstico relacionado à possibilidade de recidiva local, mostrou-se significativa quando relacionada à metástase em linfonodo sentinela ( $p=0,011$ ). Na análise multivariada esta variável entrou no modelo de regressão logística em quarta posição e manteve o modelo estável, indicando que seu poder estatístico é realmente forte. Isto significa que a invasão perineural é um dado histológico que indica pior prognóstico e maior possibilidade de metástase em linfonodo sentinela. Analisando os casos individualmente ( $n=4$ ), somente um apresentava invasão angio-linfática.

Embora não se tenha observado relação estatisticamente significativa entre a presença de metástase em linfonodo sentinela e microsatelitose ( $p=0,85$ ) vale ressaltar que a nova classificação de estadiamento do melanoma segundo a AJCC considera esta variável com o mesmo status de metástase linfonodal. Porém é definida como metástase cutânea (dérmica ou subcutânea), sob a forma de focos descontínuos de tumor em diâmetro de até 5 cm com relação ao tumor primário. No presente estudo dos cinco casos que apresentavam satelitose microscópica, três apresentaram metástase em linfonodo sentinela, porém todos eles foram considerados estadio clínico III na categoria de doença loco regional.

As demais variáveis histológicas como índice mitótico, invasão angio-linfática, infiltrado linfocitário intra e peritumoral, regressão, ulceração e margem cirúrgica não apresentaram relação estatisticamente significativa com relação a presença de metástase em linfonodo sentinela.

A pesquisa sistemática por micrometástases em linfonodo sentinela de melanomas cutâneos tornou-se crescente a partir da década de 90. A partir de então numerosos estudos foram realizados com objetivo de avaliar a eficácia e valor da mesma.

Na nova classificação do TNM do melanoma, proposta por BALCH et al. (2001), e aceita na V Conferência Internacional do Melanoma (Veneza – Itália) a pesquisa de linfonodo sentinela foi imposta para diferenciação do comprometimento nodal, microscópico do macroscópico, definindo, então, o estadiamento patológico do tumor.

Embora opiniões a respeito da pesquisa de linfonodo sentinela em melanoma cutâneo sejam controversas, diversos centros de tratamento do câncer instituíram em sua rotina diagnóstica tal prática. ESSNER et al. (2006) em seu estudo envolvendo 1327 pacientes de centros da América do Norte, Europa e Austrália confirmaram que a pesquisa de linfonodo sentinela apresentou alto valor para o estadiamento clínico em pacientes com melanomas de espessura intermediária (1,2 mm a 3,5 mm), além de melhor formulação de prognóstico com relação aos dados demográficos e patológicos definidos anteriormente. Seus resultados indicaram que quando associada à linfadenectomia radical imediata estes pacientes apresentaram melhora da sobrevida.

A pesquisa de linfonodo sentinela em melanoma cutâneo no Hospital do Câncer A C Camargo teve início a partir de 1997 sendo considerada rotina na investigação e estadiamento dos pacientes com melanoma cutâneo com espessura tumoral (Breslow) acima de 0,76mm ou na presença de regressão e/ou ulceração nos melanomas finos até hoje. A análise de 240 casos consecutivos de pesquisa

sistemática realizada na Instituição foi publicada em 2005 por DUPRAT et al. Atualmente outros pesquisadores têm utilizado esta rica fonte de dados para elaboração estudos buscando a melhor compreensão da biologia, do comportamento e evolução desta neoplasia cutânea.

A positividade encontrada na “população geral” foi de 17% quando associados os métodos de rotina e imunoistoquímica na pesquisa de micrometástases. No presente estudo setenta casos foram submetidos às reações de imunoistoquímica (pesquisa negativa na coloração de H&E), a qual foi positiva em sete casos (10%), aumentando a acurácia do método em mais de 7%, totalizando, com a coloração de rotina (H&E), 24% de positividade (20 casos), correspondendo a quase  $\frac{1}{4}$  dos casos estudados. Observa-se que no presente estudo a positividade pelo método de rotina (H&E) foi de quase 17% (14 casos), índice de positividade encontrado na “população geral” quando se associam a coloração de rotina e imunoistoquímica. Porém, quando associada à imunoistoquímica a positividade aumenta para 24%, tornando-se maior do que o índice geral. Portanto, a amostra estudada representa a população da qual foi derivada com índice de positividade de metástases em LNS maior.

PACIFICO et al. (2004) compararam dados obtidos através da técnica de tissue microarray com outros dados obtidos em cortes convencionais para estudo imunoistoquímico de melanomas sugerindo, então, o uso de quatro amostras de cada espécime para reduzir as chances de erro. No presente estudo foram utilizadas duas amostras de 1mm de diâmetro de cada tumor para confecção do bloco de TMA. As reações de imunoistoquímica foram realizadas em duas lâminas distintas totalizando quatro amostras de cada tumor. Com isso, todas as proteínas propostas no estudo foram analisadas com êxito.

## **Expressão de Ciclina D1**

Baseado em sua função na progressão do ciclo celular não é surpreendente que a ciclina D1 exerça importante papel durante a transformação maligna.

Ciclina D1 tem colaborado com vários oncogenes como Myc na indução de tumores em camundongos transgênicos, com Ras na transformação de células em cultura. Existe rearranjo gênico no locus de ciclina D1 em adenomas humanos de paratireóide e linfomas de células B. Tem se verificado amplificação e super-expressão do gene da ciclina D1 em certos casos de carcinoma escamo celular, câncer de mama, fígado e esôfago. Entretanto, pode-se observar aumento da função de ciclina D1 com baixa ou perda da amplificação do gene em alguns tumores como adenocarcinomas de cólon e tumores de bexiga, bem como carcinomas escamo celulares (GEORGIEVA et al. 2001; COQUERET 2002).

Porém, o papel da ciclina D1 no desenvolvimento, progressão e prognóstico de melanomas é controverso. Estudos mostram que não existe diferença na expressão de ciclina D1 em nevos e melanomas enquanto que outros estudos demonstram super-expressão desta proteína em melanomas.

No presente estudo foram avaliados 12 nevos melanocíticos intradérmicos observando-se positividade para ciclina D1 em 4 casos (33,3%). E, quando comparados com melanomas primários sua expressão é significativamente menor.

GEORGIEVA et al. (2001) não encontraram diferença significativa na expressão de ciclina D1 entre lesões melanocíticas benignas e malignas, observando algum nível de ciclina D1 em 46% dos nevos estudados. Este achado contrasta com os de FLORENES et al. (2002) que em seu estudo demonstrou imunoreatividade

negativa para ciclina D1 nos 10 nevos benignos estudados, INOHARA et al. (1996) e ALONSO et al. (2004) que também não observaram ciclina D1 em nenhum nevo melanocítico de seus estudos. RAMIREZ et al. (2005) verificaram que o nível de ciclina D1 também é maior em melanomas primários comparados com nevos melanocíticos.

Com isso, pode-se sugerir que a ciclina D1 pode exercer um papel importante no desenvolvimento de fenótipo maligno de melanoma. Porém, sabe-se que sua expressão está relacionada tanto a estímulo extra quanto intracelular. Então, a participação da ciclina D1 no desenvolvimento de lesões melanocíticas malignas pode não ser tão simples quanto parece.

Estudos mostram que a expressão de ciclina D1 se dá na porção juncional de nevos melanocíticos compostos. NAGASAKA et al. (1999) descrevem atividade de ciclina D1 em nevo de Spitz sendo maior na porção papilar. Estudos *in vitro* demonstraram que a atividade proliferativa de lesões melanocíticas é frequentemente confinada ao componente juncional com supressão da capacidade de crescimento uma vez que atingem a maturidade do nevo na derme.

Daí que, quando se compara os tipos histológicos e a profundidade de invasão do melanoma primário, no presente estudo, observou-se que a positividade de ciclina D1 diminui significativamente à medida que o tumor invade a derme aumentando sua espessura. Este fato demonstra que talvez possa existir uma relação inversa entre a expressão de ciclina de D1 e a progressão do tumor.

ALONSO et al. (2004) confirmam a observação de que ciclina D1 está aumentada em melanomas e, na fase radial de crescimento, ocorre aumento de sua expressão, diminuindo ao longo da derme reticular, observada na fase vertical de

crescimento do melanoma. Os dados de SAUTER et al. (2002) são consistentes com estes achados.

FLORENES et al. (2002) também verificaram alto nível de ciclina D1 correlacionado aos melanomas finos. Melanomas *in situ* expressam maior positividade de ciclina D1 do que os melanoma invasivos nos trabalhos de RAMIREZ et al. (2005) e SOARES DE SÁ (2005), que verificou positividade para ciclina D1 em 16% dos melanomas primários estudados (n=125) sendo que foi significativamente mais expressa nos melanomas *in situ* e finos. Acredita-se que as variações do microambiente do melanoma *in situ* comparado com o invasivo podem promover diferenças na expressão de ciclina D1. Além disso, pode ser devido, também, a variedade de proteínas ou outros fatores produzidos nas células próximas à membrana basal.

Quando se compara a positividade de ciclina D1 e a presença de metástases em linfonodo sentinela esta relação inversa descrita se mantém estatisticamente significativa. Por outro lado, RAMIREZ et al. (2005) encontraram que o nível de ciclina D1 de todos os melanomas primários não se correlacionou com presença de metástases da mesma forma FLORENES et al. (2002) verificaram que ciclina D1 não desempenham papel importante na progressão do tumor.

Esta observação de que melanomas invasivos não expressam ciclina D1 e que poderiam ter risco de metástase elevado quando comparados aos que apresentam positividade para ciclina D1 é, no mínimo, intrigante. Daí que o estudo de outras ciclinas envolvidas na progressão do ciclo celular poderia complementar estes dados.

GEORGIEVA et al. (2001) demonstraram aumento significativo na expressão de ciclina E e cdk2 em metástases de melanoma. BALES et al. (1999) verificou em

um grupo de 21 pacientes, que o aumento da concentração de ciclina E estava associada à melanomas espessos. Atualmente tem-se demonstrado super-expressão de ciclina E em células de tumor de mama e parece ter relação com a agressividade e estagio do tumor (KEYOMARSI et al. 1994). Uma importante conclusão do trabalho de GENG et al. (1999) foi que uma vez que a ciclina E se torna ativada a ciclina D1 é provavelmente dispensada da progressão do ciclo celular.

Pode ser que outros fatores não relacionados à progressão do ciclo celular exerçam um importante papel na agressividade do melanoma e a realização de outros estudos contribuirá para elucidar o verdadeiro papel biológico da ciclina D1 na progressão de lesões melanocíticas da pele.

Ressalta-se também, baseado neste conceito de que a expressão negativa para ciclina D1 é significativamente maior nos casos que evoluíram com metástase em linfonodo sentinela, que os melanomas finos com expressão negativa para ciclina D1 deveriam ser submetidos à linfadenectomia seletiva (linfonodo sentinela). Portanto, o estudo da expressão de ciclina D1 em melanomas finos e suas metástases seria, no mínimo, interessante. O resultado deste estudo poderá, quem sabe, provando o poder preditivo no desenvolvimento de metástase em linfonodo, instituir o estudo da expressão de ciclina D1 como mais uma dos indicadores da linfadenectomia seletiva em melanoma cutâneo.

### **Expressão de cdk4**

O ciclo celular é um processo universal pelo qual células se dividem e participam do crescimento e desenvolvimento dos organismos. A replicação do DNA, durante a fase S é precisamente comandada para prevenir eventos inadequados que levariam a instabilidade genética e ao câncer. A descoberta genética de fatores que induzem a progressão do ciclo celular em leveduras em divisão e de uma atividade que induz a mitose em ovos de rãs levaram a purificação de proteínas e a caracterização da primeira quinase dependente de ciclina (cdk), cdc2. Outros estudos em invertebrados marinhos levaram a descoberta de uma proteína instável com níveis flutuantes durante o ciclo celular que foi chamada de ciclina. Ciclinas e cdks foram então rapidamente identificadas desde fungos até mamíferos e se mostraram como reguladoras do ciclo celular.

O complexo ciclina D1/cdk4 fosforila a proteína supressora de tumor pRb, promovendo a liberação do fator transcricional E2F capaz de ativar genes responsáveis para progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular.

No presente estudo a expressão de cdk4 apresentou-se de forma homogênea e difusa no citoplasma de todas as células, sem exceção entre as células de melanoma e de nevo melanocítico. A marcação nuclear ocorreu em quase 60% das células tumorais e em 90% das células névicas, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as duas. BACHMANN et al. (2004) encontraram em seu estudo marcação nuclear em 96% dos casos e, citoplasmática em 97%, sem relação estatisticamente significativa com relação a outros marcadores como ciclina D1 e pRb. Da mesma forma GEORGIEVA et al. (2001) demonstraram positividade de

cdk4 uniforme em todas as lesões melanocíticas sem diferenças significativas entre nevo e melanomas com espessuras variadas (GEORGIEVA et al. 2001). Alguns autores relatam que em poucos casos de melanoma esporádico pode haver super-expressão do gene que codifica cdk4 (CZAJKOWSKI et al. 2002).

Em sua revisão COQUERET (2002) coloca que os níveis de cdk4 permanecem constantes através do ciclo celular e que a expressão de ciclina varia de acordo com os períodos transcricional e pós-transcricional. Com isso pode ser que, apesar de ter-se observado diminuição na expressão de ciclina D1 nos melanomas mais espessos no presente estudo, a correlação entre ciclina D1 e cdk4 existe de fato, porém não se mostra de forma tão evidente.

Não houve relação estatisticamente significativa entre a positividade de cdk4 em melanoma primário e o desenvolvimento de metástases em linfonodo sentinela.

Parece que a cdk4 não exerce um importante papel na progressão do melanoma cutâneo. Porém, ressalta-se que alguns autores verificaram super-expressão de ciclina D1 e cdk4 em outros tumores (KOONTONGKAEW et al. 2000), a expressão de cdk4 foi associada à melanomas com comportamento menos agressivo e a marcação forte de cdk4 pode estar associada a tumores finos e se faz diminuída nas metástases (BACHMANN et al. 2004).

Portanto, outros estudos devem ser realizados em maior detalhe para se verificar o quanto esta proteína está envolvida na progressão do ciclo celular em melanomas cutâneos.

## **Expressão de p16**

O maior gene de melanoma identificado até então é o CDKN2A, também conhecido como p16<sup>INK4a</sup>. Mutações ou deleções no locus 9p21 estão intimamente relacionadas a eventos na transformação de células melanocíticas.

A proteína p16 se liga especificamente a cdk4, inibindo a atividade catalítica do complexo ciclina D1/cdk4, atuando como um regulador negativo do ciclo celular. Esta proteína tem sido identificada como uma proteína supressora de tumor (SALVESEN et al. 2000).

Muitos trabalhos têm sido publicados correlacionando a participação do gene INK4a na patogênese do melanoma familiar. Mutações de p16<sup>INK4a</sup> são responsáveis por mais de 40% dos casos de melanoma familiar (WANG et al. 2005). No presente estudo esta informação não foi obtida da análise dos prontuários e, portanto, não se pode inferir se houve diferença da expressão da proteína p16 em diferentes estágios de invasão decorrentes desta variável.

O melanoma esporádico aparece como resultado do acúmulo de mutações no material genético de melanócitos normais. Uma simples modificação em um gene é provavelmente incapaz de produzir transformação neoplásica de uma célula pigmentar. O desenvolvimento de melanomas esporádicos depende da cooperação de fatores ambientais mutagênicos com certos fatores constitucionais do organismo (CZAJKOWSKI et al. 2002).

Uma desordem da expressão do gene INK4a em tumores esporádicos ocorre raramente quando comparados a melanomas familiares.

A análise da expressão da proteína p16 nos nevos melanocíticos intradérmicos, no presente estudo, verificou que todos os nevos expressaram positividade para p16 em mais de 50% das células. Tal achado demonstra a presença desta proteína controladora do ciclo celular em lesões benignas. WANG et al. (2005) também demonstram que a proteína p16 e seu RNAm são expressos da mesma forma em nevos atípicos e nevos melanocíticos banais, mas significativamente em nível reduzido em muitos melanomas, incluindo seu estado mais recente, o melanoma in situ. Melanomas em estádios precoces frequentemente mostram diminuição da expressão de p16 por repressão transcricional. Aumento de ID1, um repressor transcricional de p16, tem sido demonstrado em melanomas in situ bem como no componente in situ de melanomas invasivos e está estreitamente relacionado à diminuição de p16 nestes casos (TAKATA e SAIDA 2005).

A positividade de p16 em melanomas varia de 20 a 90%, dependendo da metodologia e material utilizados (PAVEY et al. 2002). No presente estudo 46 casos (54,8%) expressaram positividade para p16, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre os tumores com espessuras diferentes. Quando analisado somente os casos de melanoma com menos de 1mm a ausência de expressão de p16 ocorreu em pouco mais da metade dos casos (53%).

Com relação à positividade de p16 e metástase em linfonodo sentinela não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,624$ ) entre os dois grupos estudados.

Outro aspecto interessante relacionado ao gene INK4a é que a cultura isolada de células de melanoma deficientes em p16<sup>INK4a</sup> apresentam alto índice de apoptose. Na pele normal a homeostase de melanócitos é mantida pela dinâmica interação entre

os melanócitos e células do ambiente como queratinócitos e fibroblastos. Como crescimento na fase radial das células do melanoma é limitado à epiderme e derme papilar superficial tem-se sugerido que a manutenção do melanoma é dependente dos queratinócitos ou produtos derivados deles. Quando a cultura de células de melanoma deficientes em p16<sup>INK4a</sup> é realizada isolada estas células apresentaram alto índice de apoptose. Porém estes índices foram reduzidos quando estas células foram cultivadas em meios com queratinócitos ou suplementados com fator de células tronco humanas (stem cell) e endotelina 1. Estes achados demonstram o papel essencial de fatores derivados das células ambientais na sobrevivência de células precoces de melanoma (TAKATA e SAIDA 2005).

Estes resultados sugerem que uma pequena proporção de melanomas metastáticos pode crescer de um melanoma primário em fase precoce. No presente estudo dois casos de melanomas finos apresentaram metástase em linfonodos sentinela e a pesquisa de expressão de p16 resultou negativa em ambos os casos.

### **Expressão de p21**

O princípio básico da regulação do ciclo celular é a iniciação da cascata de reações de fosforilação e defosforilação de proteínas específicas. Na fase G1 estas reações estão sujeitas ao controle da via pRb ou p53. A via pRb do ciclo celular inclui as seguintes proteínas: ciclina D1- D3, cdk4/cdk6 e p16(INK4a), p15(INK4b) e p18(INK4c) que são proteínas supressoras de tumor. A permanência do ciclo celular na fase G1 também pode ocorrer com a participação de proteínas Cip/Kip

como p21(Cip1), p27(Kip1) e p57(Kip2). Estas proteínas atuam ligando-se aos complexos ciclina D1/cdk4 e ciclina E/cdk2, levando a inativação destes complexos (CJAJKOWSKI et al. 2002). A ação desta proteína está relacionada à sua ativação pela proteína p53, porém, alguns tumores podem apresentar mecanismo de ativação independente de p53 (KARJALAINEN et al. 1999).

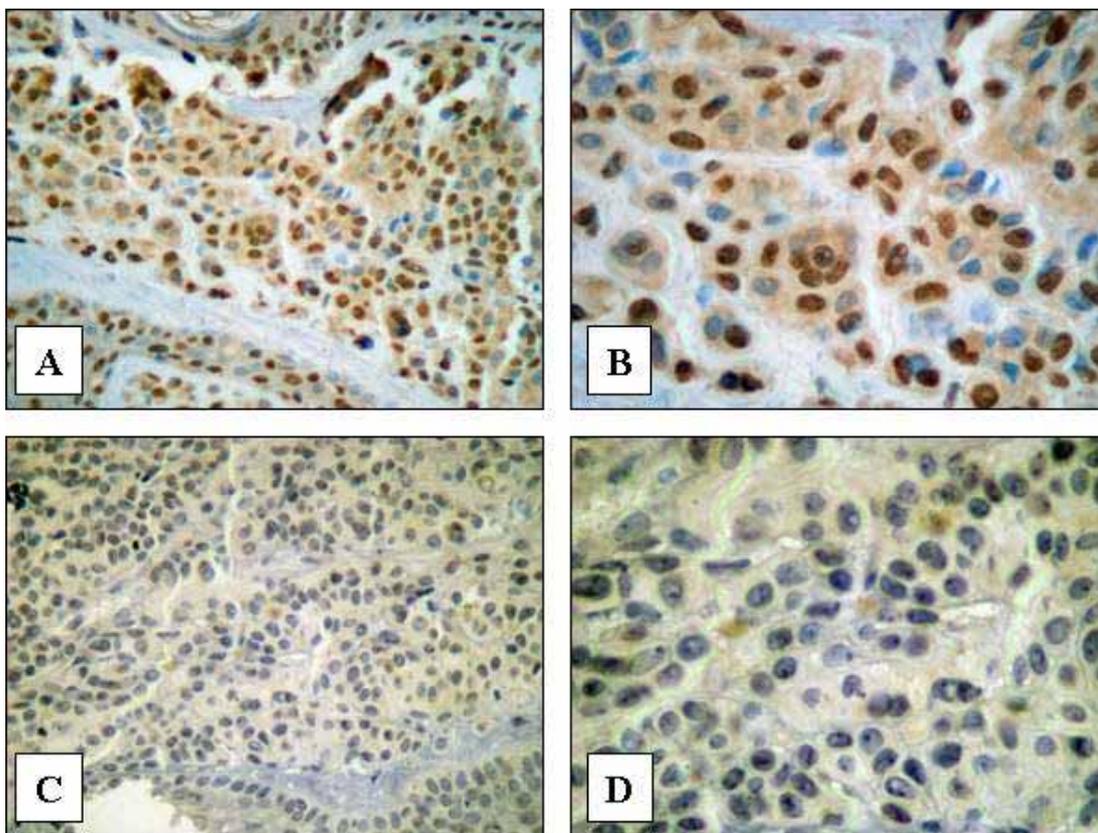
No presente estudo nenhum dos nevos melanocíticos expressou positividade para proteína p21. Porém, todos os nevos melanocíticos expressaram positividade para proteína p16. A figura 14 ilustra a expressão das proteínas p16 e p21 nos nevos melanocíticos do estudo. Pode-se inferir que a via de controle da progressão do ciclo celular está sendo efetuada pela expressão de p16 (via pRb) nestas lesões melanocíticas benignas.

A expressão de p21 é descrita como aumentada em melanomas avançados quando comparada com a expressão em lesões benignas (MAELANDSMO et al. 1996; TROTTER et al. 1997; BALES et al. 1999). No presente estudo vinte e dois casos expressaram positividade nuclear para proteína p21 (26,2%). Em acordo com TROTTER et al. (1997), no presente estudo não houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes expressões de p21 e a espessura do tumor. Porém na literatura observa-se que não existe consenso entre a expressão de p21 e a espessura dos tumores (MAELANDSMO et al. 1996; KARJALAINEN et al. 1999).

Quando se associa a expressão da proteína p16 à expressão da proteína p21 observa-se que 34,5% dos casos (n=29) não expressam nenhuma destas proteínas. Mesmo assim, dentre estes casos somente seis apresentaram metástase em LNS. Também não foi observada correlação estatisticamente significativa entre a expressão de p21 e metástases em linfonodo sentinela. Fato controverso comparado

aos achados de MAELANDSMO et al. (1996) que sugeriram que a perda de expressão de p21 poderia estar relacionada com o fenótipo metastático destes tumores.

No presente estudo a positividade para ambas as proteínas foi observada em 13 casos (15,5%). Com isso, metade dos casos apresenta positividade para somente uma das proteínas reguladoras do ciclo celular: p16 (39,3%) ou p21 (10,7%). O predomínio pela via de pRb parece favorecer os achados de BACHMANN et al. (2004) que concluíram que as alterações da via p21-p53 são menos significativas em relação à via p16-Rb na progressão de tumores.



**Legenda:** A) expressão nuclear positiva para p16 nas células névicas (X100). B) detalhe das células névicas com expressão nuclear para p16 (X400). C) expressão nuclear negativa para p21 nas células névicas (X100). D) detalhe das células névicas com expressão nuclear para p21 (X400).

**Figura 14** - Estudo imunoistoquímico para p16 e p21 nas células névicas.

### **Expressão de metaloproteinases MMP-2 e MMP-9**

O papel das metaloproteinases (MMPs) na invasão e metástase de muitos tipos de tumores têm sido amplamente estudado. Empregando técnicas de imunistoquímica e/ou hibridização *in situ*, os diversos estudos têm demonstrado que ambas as células, tumorais e estromais, expressam MMPs. A interação complexa entre as células tumorais e as células que circundam o tumor ainda não está completamente compreendida.

Diferentes sistemas enzimáticos proteolíticos incluindo o sistema ativador de plasminogênio, protease do ácido aspártico, protease da cisteína e as MMPs tem sido identificados na progressão do melanoma cutâneo (HOFMANN et al. 2000b).

A respeito das MMPs, níveis de expressão de diversos componentes podem estar aumentados, incluindo MMP-1, MMP-2, MT1-MMP, MMP-9, MMP-13 bem como TIMP-1 e TIMP-3. Muitas destas enzimas foram detectadas em células de melanoma bem como nas células estromais circundando o tumor, indicando que existe uma importante interação recíproca entre as células tumorais e as células estromais.

No presente estudo a expressão de MMP-2 e MMP-9 nas células tumorais foi traduzida em números através da adaptação do método de SOINI et al. (2001) que consideram a intensidade da marcação e a proporção de células tumorais marcadas. Neste caso o sistema de pontuação utilizou a intensidade da marcação nuclear e citoplasmática definindo, então, quatro categorias distintas: negativo, leve, moderada e intensa. Com isso, procurou-se antever a possibilidade de correlação entre as

células tumorais com intensidade da marcação diferente e as características clínicas e/ou histopatológicas do tumor, além da presença de metástase em LNS.

Os resultados obtidos mostram que não houve diferença estatisticamente significativa entre a positividade de MMP-2 e MMP-9 nas células tumorais quando comparadas à espessura do tumor (Breslow), bem como na presença de metástase em LNS.

Os trabalhos da literatura não apresentam consenso a respeito da forma de avaliação das reações por imunistoquímica, além disso muitos destes estudos utilizaram cortes histológicos convencionais, sendo que a leitura das reações considerou a localização das células tumorais, a relação destas células com o estroma adjacente, comparando a intensidade da marcação entre as diversas células (VAN DER OORD 1997; VAISANEN et al. 1998; HOFMANN et al. 2000b).

Estudos demonstram que a ativação da pro-MMP-2 requer a ativação da MT1-MMP e de seu inibidor tecidual TIMP-2. A expressão de ambas as proteínas MMP-2 e MT1-MMP foi demonstrada em melanomas primários e metástase de melanomas enquanto que TIMP-2 estava fortemente expressa em lesões benignas e malignas. Experimentos com duas colorações demonstraram que todas as células tumorais que expressam MMP-2 também expressam MT1-MMP e TIMP-2. Estes resultados indicam que o aumento da expressão de MT1-MMP está associado com o aumento da expressão e ativação da MMP-2 e que ambos estão relacionados com a progressão de tumores melanocíticos malignos.

Uma relação inversa entre a expressão de MMP e progressão de melanoma foi encontrada para MMP-9. Em contraste com dados *in vitro* MACDOUGALL et al. (1999) e MMP-9 foi exclusivamente expresso na fase de crescimento horizontal e

estava ausente na fase de crescimento vertical, sugerindo que esta expressão está envolvida no evento precoce de degradação da matriz extracelular e invasão de células do melanoma.

Não existe na literatura a utilização de TMA na avaliação da expressão de MMPs por imunistoquímica. Portanto, os resultados obtidos neste estudo devem ser analisados com cautela. Novos estudos devem ser realizados tais como estudos comparativos entre a técnica de TMA e cortes convencionais, avaliação de expressão e MMP em melanomas *in situ* e melanomas finos, estudos que validam a representatividade do tumor em TMA para MMP, estudo de outras MMPs e TIMPs, dentre outros.

Estes novos estudos contribuirão para o conhecimento detalhado sobre o significado biológico de cada fator envolvido na adesão das células tumorais e as células adjacentes da matriz celular, estabelecendo uma compreensão das alterações temporais no desenvolvimento do câncer permitirão o desenvolvimento de ferramentas capazes de aprimorar o diagnóstico, o prognóstico e o tratamento do melanoma cutâneo.

### **Expressão de $\alpha v \beta 3$**

Diversas linhas de evidências indicam interação entre MMPs e moléculas de adesão. As integrinas fazem parte de uma grande família de glicoproteínas transmembranas compostas pela união não covalente de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . São receptores

multifuncionais que não só mediam a ancoragem celular à matriz extra-celular, mas também regula a expressão de genes de apoptose.

Expressão de integrina  $\alpha\beta3$  tem sido correlacionada a tumorigênese, invasão e potencial metastático. Em células de melanoma metastático  $\alpha\beta3$  estava super-expressa 50 a 100 vezes mais do que em melanócitos normais (HOFMANN et al. 2005).

A análise de expressão de  $\alpha\beta3$  foi realizada em todos os casos do estudo. HOFMANN et al. (2005) demonstraram em seus estudos que não houve expressão de  $\alpha\beta3$  em melanomas *in situ*. No presente estudo observou-se positividade em 21,7% dos melanomas com menos de 1mm de espessura. A expressão de  $\alpha\beta3$  foi positiva em 69 casos (82,1%) não havendo diferença estatisticamente significativa entre a positividade e a espessura do tumor (Breslow). Com relação a presença de metástases em linfonodo sentinela também não se verificou diferença estatisticamente significativa com relação à expressão de  $\alpha\beta3$ .

BROOKS et al. (1996) demonstraram que a MMP-2 ativada liga-se diretamente a integrina  $\alpha\beta3$  através do domínio haemopexin-like no carbono C-terminal (PEX) facilitando a degradação da matriz extracelular e invasão celular. Esta interação facilita o posicionamento da MMP na superfície da célula.

No presente estudo quando se analisa a expressão de MMP-2 juntamente com  $\alpha\beta3$ , verifica-se que nos casos com expressão negativa para MMP-2 (n=6) a expressão de  $\alpha\beta3$  é negativa em dois deles e, fraca em outros dois e moderada nos demais. Não houve expressão intensa de  $\alpha\beta3$  em casos negativos para MMP-2. Por outro lado, os casos com expressão positiva de MMP-2 (n=78) apresentam concomitante expressão de  $\alpha\beta3$ , considerada moderada e intensa, em 46,1% (n=36).

Ressalta-se que nenhum caso em que a expressão de  $\alpha\upsilon\beta 3$  foi considerada intensa foi negativo para a expressão de MMP-2. Estes achados também são consistentes com os de HOFMANN et al. (2000a) que em uma série de 46 melanomas cutâneos observou que a expressão positiva para  $\alpha\upsilon\beta 3$  e MMP-2 foi aumentada nos melanomas primários e metástases de melanoma e que o número de células tumorais que expressaram MMP-2 e  $\alpha\upsilon\beta 3$  também foi elevado.

Considerando-se os resultados obtidos pode-se propor a realização de outros estudos tais como a avaliação de proteínas do ciclo celular como ciclina E e CDK2 na progressão do melanoma cutâneo; estudo da avaliação de metaloproteinases 2 e 9 através da técnica convencional e de TMA em diversas lesões melanocíticas, dentre outros.

O melanoma cutâneo continua sendo uma neoplasia intrigante e que desperta o interesse científico de inúmeros pesquisadores. O presente estudo é mais um fruto do constante desafio pelo entendimento dos eventos moleculares envolvidos na gênese e progressão desta neoplasia.

## 6 CONCLUSÕES

1. O banco de dados criado com informações a respeito dos casos de melanoma cutâneo de pacientes submetidos à linfadenectomia seletiva (linfonodo sentinela) permitiu a realização do presente estudo e disponibiliza dados para diversos outros estudos.
2. O *tissue microarray* proposto foi confeccionado com sucesso e permitiu a análise imunoistoquímica dos marcadores biológicos propostos e disponibiliza mais de 70 lâminas para estudos futuros.
3. A espessura do tumor (Breslow) continua sendo o fator prognóstico de maior impacto no desenvolvimento de metástases em linfonodo sentinela.
4. A variável histológica invasão perineural, embora presente em um número reduzido de casos, apresentou-se estatisticamente significativa quando correlacionada à metástase em linfonodo sentinela.
5. Verificou-se correlação entre a ausência de expressão de ciclina D1 e presença de metástase em linfonodo sentinela. Tal correlação mostrou-se estatisticamente significativa tanto na análise univariada quanto na análise multivariada. Portanto, é provável que a ausência de ciclina D1 possa ser considerada como fator prognóstico para o desenvolvimento de metástases nodais de melanoma cutâneo.
6. A expressão de CDK4 parece não ter importância como fator preditivo de metástases nodais de melanoma cutâneo.

7. A expressão da proteína p16 em 53% dos casos estudados não demonstrou correlação com a profundidade da infiltração dérmica, bem como com o desenvolvimento de metástase em linfonodo.
8. Todos os nevos melanocíticos estudados (intradérmicos) expressaram positividade para proteína p16, sendo negativa a expressão de p21 em todos eles. Esta observação sugere que nestas lesões melanocíticas benignas o controle do ciclo celular é realizado pela via p16/pRb.
9. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão de MMP-2 e MMP-9 nas células tumorais quando comparadas às células melanocíticas, à espessura do tumor (Breslow), bem como à presença de metástase em linfonodo sentinela.
10. No presente estudo também se observou correlação positiva entre a expressão de  $\alpha v\beta 3$  e MMP-2 de acordo com a literatura. Porém ambas as proteínas não mostraram correlação estatisticamente significativa com desenvolvimento de metástases linfonodais.
11. O presente estudo, através da análise de cortes histológicos convencionais e de TMA, analisou os parâmetros histopatológicos e expressão de proteínas por estudo imunoistoquímico correlacionando-os com sucesso.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Molecular biology of the cell**. 4<sup>th</sup> ed. New York: Garland Science; 2002a. The cell cycle and programmed cell death; p.983-1026.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Molecular biology of the cell**. 4<sup>th</sup> ed. New York: Garland Science; 2002b. Cancer; p.1313-62.

Albino AP, Reed JA, McNutt NS. Molecular biology of cutaneous malignant melanoma. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg AS, editors. **Cancer: principles and practice of oncology**. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Raven; 1997. p.1935-46.

Alonso SR, Ortiz P, Pollan M, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles a tissue microarray-based Study. **Am J Pathol** 2004; 164:193-203.

Armstrong B. Epidemiology of cutaneous melanoma and current trends. In: Thompson JF, Morton DL, Kroon BBR, editors. **Textbook of melanoma**. London: Martin Diniz; 2004. p.65-80.

Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Altered expression of cell cycle regulators Cyclin D1, p14, p16, CDK4 and Rb in nodular melanomas. **Int J Oncol** 2004; 25:1559-65.

Bakos L, Wagner M, Bakos RM, et al. Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in Southern Brazil. **Int J Dermatol** 2002; 41:557-62.

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. **J Clin Oncol** 2001; 19:3635-48.

Bartkova J, Lukas J, Guldborg P, et al. The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. **Cancer Res** 1996; 56:5475-83.

Bataille V. Genetic epidemiology of melanoma. **Eur J Cancer** 2003; 39:1341-7.

Bales ES, Dietrich C, Bandyopadhyay D, et al. High levels of expression of p27KIP1 and cyclin E in invasive primary malignant melanomas. **J Invest Dermatol** 1999; 113:1039-46.

Bennett DC. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. **Oncogene** 2003; 22:3063-9.

Blessing K, McLaren KM, McLean A, Davidson P. Thin malignant melanomas (less than 1.5 mm) with metastasis: a histological study and survival analysis. **Histopathology** 1990; 17:389-95.

Breslow A. Thickness, cross sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. **Ann Surg** 1970; 172:902-8.

Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. **Cell** 1996; 85:683-93.

Bury J, Cross S. Molecular biology in diagnostic histopathology: Part I – The cell cycle. **Curr Diag Pathol** 2003 9:266-75.

Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. **Cancer** 1977; 39:456-66.

Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. **Cancer Res** 1969; 29:705-27.

Cook J. Surgical margins for resection of primary cutaneous melanoma. **Clin Dermatol** 2004;22:228-33.

Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. **Gene** 2002; 299:35-55.

Czajkowski R, Drewna T, Wozniak A, Krzyzyska-Malinowska E. Cell cycle in sporadic melanoma. **Int J Dermatol** 2002; 41:550-6.

de Vries E, Schouten LJ, Visser O, Eggermont AM, Coebergh JW; Working Group of Regional Cancer Registries. Rising trends in incidence of and mortality from cutaneous melanoma in Netherlands: a Northwest to Southeast gradient? **Eur J Cancer** 2003; 39:1439-46.

Dawson-Saunders B, Trapp RG. **Basic and clinical biostatistics**. New York: McGraw-Hill; 2004. Research questions about two separate on independent groups; p.134-61.

Duprat JP, Silva DC, Coimbra FJ, et al. Sentinel lymph node biopsy in cutaneous melanoma: analysis of 240 consecutive cases. **Plast Reconstr Surg** 2005; 157:1944-51.

Essner R, Scheri R, Kavanagh M, Torisu-Itakura H, Wanek LA, Morton DL. Surgical management of the groin lymph nodes in melanoma in the era of sentinel lymph node dissection. **Arch Surg** 2006; 141:877-84.

Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. **Science** 1996; 274:1664-72.

Florenes VA, Faye RS, Maelandsmo GM, Nesland JM, Holm R. Levels of cyclin D1 and D3 in malignant melanoma: deregulated cyclin D3 expression is associated with poor clinical outcome in superficial melanoma. **Clin Cancer Res** 2000; 6:3614-20.

Flores JF, Walker GJ, Glendening JM, et al. Loss of p16INK4a and p15INK4b genes as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma. **Cancer Res** 1996; 56:5023-32.

Geng Y, Whoriskey W, Park MY, et al. Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. **Cell** 1999; 97:767-77.

Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. **J Clin Pathol** 2001; 54:229-35.

Gerbaud L, Lejeune ML, Abou-Samra T, et al. Epidemiological survey of melanoma in auvergne region (France): is there an increased incidence in auvergne? **Eur J Epidemiol** 2003; 18:331-5.

Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: Role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). **Oncogene** 1995; 11:211-9.

Green CL, Khavari PA. Targets for molecular therapy of skin cancer. **Semin Cancer Biol** 2004; 14:63-9.

Gruss C, Herlyn M. Role of cadherins and matrixins in melanoma. **Curr Opin Oncol** 2001; 13:117-23.

Heaton KM, Sussman JJ, Gershenwald JE, et al. Surgical margins and prognostic factors in patients with thick (>4mm) primary melanoma. **Ann Surg Oncol** 1998; 5:322-8.

Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Becker JC, Ruiter DJ, van Muijen GN. Coexpression of integrin alphavbeta3 and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. **J Invest Dermatol** 2000a; 115:625-32.

Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. **J Invest Dermatol** 2000b; 115:337-44.

Hofmann UB, Houben R, Brocker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. **Biochimie** 2005; 87:307-14.

Holland EA, Beaton SC, Becker TM, et al. Analysis of the p16 gene CDKN2, in 17 Australian melanoma kindreds. **Oncogene** 1995; 11:2289-94.

Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. **Am J Pathol** 2001; 158:1245-51.

Inohara S, Kitagawa K, Kitano Y. Expression of cyclin D1 and p53 protein in various malignant skin tumors. **Dermatology** 1996; 192:94-8.

Jakub JW, Pendas S, Reintgen DS. Current status of sentinel lymph node mapping and biopsy: facts and controversies. **Oncologist** 2003; 8:59-68.

Karjalainen JM, Eskelinen MJ, Kellokoski JK, Reinikainen M, Alhava EM, Kosma VM. p21 WAF1/CIP1 expression in stage I cutaneous malignant melanoma: its relationship with p53, cell proliferation and survival. **Br J Cancer** 1999; 79:895-902.

Katalinic A, Kunze U, Schafer T. Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Scheleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumor stages and localization (epidemiology of skin cancer). **Br J Dermatol** 2002; 149:1200-6.

Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ, Pardee AB. Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. **Cancer Res** 1994; 54:380-5.

Kim CJ, Reintgen DS, Yeatman TJ. The promise microarray technology in melanoma care. **Cancer Control** 2002; 9:49-53.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. **Int J Cancer** 2001; 92:276-84.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4:844-7.

Koontongkaew S, Chareonkitkajorn L, Chanvitan A, Leelakriangsak M, Amornphimoltham P. Alterations of p53, pRb, cyclin D(1) and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. **Oral Oncol** 2000; 36:334-9.

Li X, Regezi J, Ross FP, et al. Integrin alphavbeta3 mediates K1735 murine melanoma cell motility in vivo and in vitro. **J Cell Sci** 2001; 114:2665-72.

Mackie RM, Bray CA, Hole DJ, et al. Incidence of and survival from malignant melanoma in Scotland: an epidemiological study. **Lancet** 2002; 360:587-91.

MacDougall JR, Bani MR, Lin Y, Muschel RJ, Kerbel RS. Proteolytic switching': opposite patterns of regulation of gelatinase B and its inhibitor TIMP-1 during human melanoma progression and consequences of gelatinase B overexpression. **Br J Cancer** 1999; 80:504-12.

Maelandsmo GM, Holm R, Fodstad O, Kerbel RS, Florenes VA. Cyclin kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in malignant melanoma: reduced expression in metastatic lesions. **Am J Pathol** 1996; 149:1813-22.

Mangini J, Li N, Bhawan J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions. **Am J Dermatopathol** 2002; 117:270-81.

McMasters KM, Sondak VK, Lotze MT, Ross MI. Recent advances in melanoma staging and therapy. **Ann Surg Oncol** 1999; 6:467-75.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas/2006 da incidência por câncer**. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Morton DL, Wen DR, Wong JH, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early melanoma. **Arch Surg** 1992; 127:392-9.

Nagasaka T, Lai R, Medeiros LJ, et al. Cyclin D1 overexpression in Spitz nevi: an immunohistochemical study. **Am J Dermatopathol** 1999; 21:115-20.

Nguyen TH. Mechanisms of metastasis. **Clin Dermatol** 2004; 22:209-16.

Ohta M, Nagai H, Shimizu M, et al. Rarity of somatic and germline mutations of cyclin-dependent kinase 4 inhibitor gene, CDK41, in melanoma. **Cancer Res** 1994; 54:5269-72.

Ohta M, Berd D, Shimizu M, et al. Deletion mapping of chromosome region 9p21-p22 surrounding the CDKN2 locus in melanoma. **Int J Cancer** 1996; 65:762-7.

Pacifico MD, Grover R, Richman P, Daley F, Wilson GD. Validation of tissue microarray for the immunohistochemical profiling of melanoma. **Melanoma Res** 2004; 14:39-42.

Parmiter RH, Nowell PC. Cytogenetics of nevocytic nevi. **J Invest Dermatol** 1993; 100:2545-85.

Pasco S, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC. Control of melanoma progression by various matrixes from basement membrane macromolecules. **Crit Rev Oncol Hematol** 2004; 49:221-33.

Pavey SJ, Cummings MC, Whiteman DC, et al. Loss of p16 expression is associated with histological features of melanoma invasion. **Melanoma Res** 2002; 12:539-47.

[QCR] Queensland Cancer Registry Health Information Centre Queensland Health Level. **Cancer in Queensland incidence and mortality 1982 to 1998**. Available from: <URL:<http://www.health.qld.gov.au/hic/1998cancer.pdf>> [2005 maio 12].

Ramirez JA, Guitart J, Rao MS, Diaz LK. Cyclin D1 expression in melanocytic lesions of the skin. **Ann Diagn Pathol** 2005; 9:185-8.

Rane SG, Cosenza SC, Mettus RV, Reddy EP. Germ line transmission of Cdk4R24C mutation facilitates tumorigenesis and escape from cellular senescence. **Mol Cell Biol** 2002; 22:644-56.

Reed JA, Loganzo F Jr, Shea CR, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. **Cancer Res** 1995; 55:2713-8.

Rizos H, Becker TM, Holland EA. Cell cycle regulation in melanocyte. In: Thompson JF, Morton DL, Kroon BBR, editors. **Textbook of melanoma**. London: Martin Dunitz; 2004. p.13-24.

Robertson G, Coleman A, Lugo TG. A malignant melanoma tumor suppressor on human chromosome 11. **Cancer Res** 1996; 56:4487-92.

Saha S, Dan AG, Bilchik AJ, et al. Historical review of lymphatic mapping in gastrointestinal malignancies. **Ann Surg Oncol** 2004; 11:245s-9s.

Salvesen HB, Das S, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinomas with poor prognosis. **Clin Cancer Res** 2000; 6:153-9.

Sauter ER, Yeo UC, von Stemm A, Zhu W, Litwin S, Tichansky DS, Pistritto G, Nesbit M, Pinkel D, Herlyn M, Bastian BC. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. **Cancer Res** 2002; 62:3200-6.

Scatena M, Giachelli C. The  $\alpha(v)\beta3$  integrin, NF-kappaB, osteoprotegerin endothelial cell survival pathway: potential role in angiogenesis. **Trends Cardiovasc Med** 2002; 12:83-8.

Shen SS, Zhang PS, Eton O, Prieto VG. Analysis of protein tyrosine kinase expression in melanocytic lesions by tissue array. **J Cutan Pathol** 2003; 30:539-47.

Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. **Genes Dev** 1995; 9:1149.

Simonato Neto D, Pantaleão L, Soares de Sá BC, Landman G.  $\alpha v \beta 3$  integrin expression in melanocytic nevus and cutaneous melanoma. **J Cut Pathol** 2005 *in press*

Siskind V, Whiteman DC, Aitken JF, Martin NG, Green AC. An analysis of risk factors for cutaneous melanoma by anatomical site (Australia). **Cancer Causes Control** 2005; 16:193-9.

Slominski A, Wortsman J, Nickoloff B, et al. Molecular pathology of malignant melanoma. **Am J Clin Pathol** 1998; 110:788-94.

Slominski A, Wortsman J, Carlson AJ, Matsuoka LY, Balch CM, Mihm MC. Malignant melanoma. **Arch Pathol Lab Med** 2001; 125:1295-306.

Soares de Sa BC. **Criação de “tissue array” de melanomas cutâneos extensivos superficiais para estudo imunohistoquímico de fatores ligados à proliferação e apoptose celular.** São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Soini Y, Puhakka A, Kahlos K, et al. Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or expression of VEGF, FLK1 or FLT1. **Histopathology** 2001; 39:179-86.

Su YA, Trent JM. Genetics of cutaneous malignant melanoma. **Cancer Control** 1995; 2:392-7.

Sviderskaya EV, Gray-Schopfer VC, Hill SP, et al. p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2A deficiency in human melanocyte senescence, apoptosis, and immortalization: possible implications for melanoma progression. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:723-32.

Takata M, Saida T. Early cancers of the skin: clinical, histopathological, and molecular characteristics. **Int J Clin Oncol** 2005; 10:391-7.

Trikha M, Timar J, Zacharek A, et al. Role of beta3 integrins in human melanoma growth and survival. **Int J Cancer** 2002; 101:156-67.

Trotter MJ, Tang L, Tron VA. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) in human cutaneous malignant melanoma. **J Cutan Pathol** 1997; 24:265-71.

Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and 9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. **Biochimie** 2005; 87:287-97.

Vaisanen A, Kallioinen M, Taskinen PJ, Turpeenniemi-Hujanen T. Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma. **J Pathol** 1998; 186:51-8.

van den Oord JJ, Paemen L, Opdenakker G, de Wolf-Peeters C. Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. **Am J Pathol** 1997; 151:665-70.

Wang H, Presland RB, Piepkorn M. A search for CDKN2A/p16INK4a mutations in melanocytic nevi from patients with melanoma and spouse controls by use of laser-captured microdissection. **Arch Dermatol** 2005; 141:177-80.

Yudd AP, Kempf JS, Goydos JS, Stahl TJ, Feinstein RS. Use of sentinel node lymphocintigraphy in malignant melanoma. **Radiographics** 1999; 19:343-56.

Zhang H, Rosdahl I. Deletion in p16INK4a and loss of p16 expression in human skin primary and metastatic melanoma cells. **Int J Oncol** 2004; 24:331-5.