

**DERMATOFIBROSSARCOMA PROTUBERANS:  
ANÁLISE DOS MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO  
CELULAR, INVASIVIDADE E APOPTOSE, ESTUDO  
DA FUSÃO DE COL-1 $\alpha$ 1/PDGF- $\beta$  POR FISH E  
CORRELAÇÃO COM A RECIDIVA**

**ANDRÉ SAPATA MOLINA**

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

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. João Pedreira Duprat Neto**

**Co-Orientadora: Dra. Isabela Werneck da  
Cunha**

**São Paulo**

**2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Molina, André Sapata

**Dermatofibrossarcoma protuberans: Análise dos marcadores de proliferação celular, invasividade e apoptose, estudo da fusão de COL-1 $\alpha$ 1/PDGF- $\beta$  por FISH e correlação com a recidiva** / André Sapata Molina – São Paulo, 2012.

88p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências

Área de concentração: Oncologia.

Orientador: João Pedreira Duprat Neto

Descritores: 1. DERMATOFIBROSSARCOMA PROTUBERANS. 2. PROLIFERAÇÃO CELULAR. 3. APOPTOSE. 4. COLAGENO TIPO I. 5. IMUNOISTOQUÍMICA. 6. HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE. 7. FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS.

## DEDICATÓRIA

**À Deus**, pela minha vida.

**Ao meu filho Bruno Molina**, por um novo sentido em minha vida.

**Aos meus pais, Nelson e Luzia**, pela dedicação à minha criação, de minha irmã e agora de meu filho Bruno. Por sempre me estimularem a concretizar meus desejos e estarem presentes nos melhores momentos de minha vida.

**À minha irmã, Ana Paula**, por nunca faltar com apoio e pela ajuda nesta dissertação.

## **AGRADECIMENTOS**

**Ao Dr. João Pedreira Duprat Neto**, pela confiança em meu trabalho, por sua amizade e seu comprometimento com nosso grupo e pesquisa.

**À Dra. Isabela Werneck**, pela ajuda que foi fundamental para a realização deste projeto.

**Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**, pela ajuda com o aparelho Scanscope® e o software Aperio®, assim como pelo excelente trabalho a frente da pós-graduação.

**Aos meus colegas do Núcleo de Câncer de Pele e Dermatologia**, pelo apoio profissional e amizade.

**Ao Departamento de Anatomia Patológica**, por toda a ajuda e comprometimento com meu trabalho.

**Ao André Oliveira**, Mayo Clinic, U.S.A., pela ajuda com a análise de FISH.

**À Suely Francisco**, pela ajuda na formatação final da tese.

**À Luciana Facure Moredo**, minha colega de pós-graduação que compartilhei todas dúvidas e dificuldades durante o curso.

**Às Sras. Ana Maria Kurinari, Luciana Pitombeira, Cíntia Souza e Vanuza Barros** pelo suporte durante todo o curso de Pós-Graduação.

**À Vanuza**, pelo apoio durante estes dois anos de pós-graduação.

**Ao Dr. José Humberto Fregnani**, pelas análises estatísticas.

**Às mais que amigas, Vanessa, Janaína e Evandra,** por compartilharem suas vidas comigo e minha família.

**Ao Amigo Heber Salvador de Castro Ribeiro,** pela amizade e por sua extrema confiança em mim, que me motivou desde o início da residência de Cirurgia Oncológica.

**Ao amigo Abner,** pela amizade e amor com minha família e pelos momentos compartilhados em nossa residência de Cirurgia Oncológica.

**Às amigas e colegas, Juliana Areas, Juliana Machado e os amigos Daniel e Henrique,** pelo apoio e amizade.

**Aos Amigos Juliana Casagrande, Flávio Braga, Ricardo Rezende e Aline,** a amizade de vocês é muito preciosa.

**Ao amigo e colega Marcelo Inada,** pela cooperação nestes anos no A. C. Camargo.

**Ao meu amigo Danilo Vivas,** o membro mais novo da família.

**Ao Dr. Eduard,** pelos ensinamentos durante estes 3 anos de departamento.

## RESUMO

Molina AS. **Dermatofibrossarcoma protuberans: análise dos marcadores de proliferação celular, invasividade e apoptose, estudo da fusão de COL-1 $\alpha$ 1/PDGF- $\beta$  por FISH e correlação com a recidiva.** São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

**Introdução:** O dermatofibrossarcoma protuberans é um tumor de baixa incidência e apresenta controvérsias em seu manejo. Não costuma ser letal mas o tratamento pode ser mutilador para o paciente. **Objetivos:** Avaliar as características dos pacientes, do tratamento realizado, as expressões imunoistoquímicas de marcadores de invasividade, apoptose e proliferação celular, e a presença da fusão dos genes COL-1 $\alpha$ 1/PDGF- $\beta$  por FISH e correlacioná-los com o prognóstico. **Métodos:** Foi realizada análise retrospectiva de prontuários de 61 pacientes com dermatofibrossarcoma, assim como foi realizada revisão de todos blocos de parafina. As lâminas foram escaneadas no Scanscope e avaliadas pelo software Aperio. Para detecção das translocações foi utilizado fluorescência por hibridização in situ. **Resultados:** Dos 61 pacientes tratados, apenas 6 apresentaram recidivas. Nenhum paciente operado com margens de segurança de pelo menos 3 cm apresentou recorrência ( $p=0,014$ ). Nesta análise, houve apenas uma recidiva em pacientes tratados com margem cirúrgica de pelo menos 2 cm, havendo diferença estatística quando comparado com pacientes tratados com margens menores que 2 cm. Dentre os pacientes operados no HACC, os que receberam o primeiro tratamento no HACC apresentaram taxa de recidiva menor do que pacientes recidivados após tratamento em outro hospital, porém não houve significância estatística ( $p=0,387$ ). A frequência de translocações nestes pacientes foi de 77,8%, valor inferior aos 90% descritos na literatura. Pacientes que apresentavam a translocação tiveram recorrência de 5,7%, enquanto os pacientes sem a translocação tiveram recorrência de 30% ( $p=0,065$ ). Os marcadores imunoistoquímicos

não se relacionaram com a taxa de recorrência, mas quando considerado pacientes tratados com margens menores que 3 cm houve relação com a expressão do FASL ( $p=0,048$ ). **Conclusões:** As margens cirúrgicas mostraram correlação com a recorrência em pacientes com dermatofibrossarcoma, porém margens de segurança de 2 cm foram aceitáveis para o tratamento, ao contrário da recomendação tradicional de 3cm. Margens menores que 2 cm estão relacionadas com maior taxa de recorrência. Dentre os marcadores imunoistoquímicos pesquisados, apenas o FASL correlacionou-se com taxa de recorrência em pacientes com margens de segurança menores que 3 cm. A presença da translocação cromossômica parece ter influência no prognóstico, porém é necessário uma amostra maior para uma análise estatística mais fidedigna.

## SUMMARY

Molina AS. **[Dermatofibrosarcoma protuberans: analysis of markers of cell proliferation, invasiveness and apoptosis, study of fusion COL-1 $\alpha$ 1/PDGF- $\beta$  by FISH and correlation with relapse]**. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

**Introduction:** Dermatofibrosarcoma protuberans is a tumor with low incidence and present controversies in its management. It is not usually lethal but treatment can be mutilating to the patient. **Objectives:** To evaluate patient characteristics, treatment performed, the immunohistochemical expression of markers of invasiveness, apoptosis and cell proliferation, and the presence of fusion genes COL-1A1/PDGF- $\beta$  by FISH and correlate them with prognosis. **Methods:** We conducted a retrospective analysis of medical records of 61 patients with dermatofibrosarcoma and all paraffin blocks was reviewed. The slides were scanned by the Scanscope and evaluated by Aperio software. For detection of translocations, it was used fluorescence in situ hybridization. **Results:** Of 61 patients, only 6 had relapses. No patient operated with a safety margin of at least 3 cm had recurrence ( $p = 0.014$ ). In this analysis, there was only one recurrence in patients treated with surgical margins of at least 2 cm, with a statistical difference when compared with patients treated with margins smaller than 2 cm. Among patients operated on HACC, those who received first treatment in HACC had lower relapse rate than patients relapsed after treatment at another hospital, but there was no statistical significance ( $p = 0.387$ ). The frequency of translocations in these patients was 77.8%, lower than the 90% reported in the literature. Patients with the translocation had recurrence of 5.7%, while patients without the translocation had recurrence of 30% ( $p = 0.065$ ). The immunohistochemical markers did not correlate with the recurrence rate, but when considered patients with margins less than 3 cm there was relation with the expression of FASL ( $p = 0.048$ ). **Conclusions:** The surgical margins correlated with

recurrence in patients with dermatofibrosarcoma, but a safety margin of 2 cm were acceptable for treatment, unlike the traditional recommendation of 3 cm. Margins smaller than 2 cm are associated with higher recurrence rate. Among the immunohistochemical markers studied, only the FASL correlated with recurrence rate in patients with security margins lesser than 3 cm. The presence of chromosomal translocation seems to influence prognosis, but a larger sample is needed for a statistical analysis more reliable.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Microfotografia.....	2
<b>Figura 2</b>	Microfotografia.....	3
<b>Figura 3</b>	Microfotografia - Imunoistoquímica positiva para CD34 no DFSP. Diâmetro do spot 1mm.....	4
<b>Figura 4</b>	Microfotografia DFSP HE, padrão de crescimento com projeções do tumor, preservando feixe vasculho-nervoso.....	5
<b>Figura 5</b>	Padrão de crescimento do DFSP infiltrando o tecido adiposo	5
<b>Figura 6</b>	Diferença histológica e do número de cópias do gene mutado.....	7
<b>Figura 7</b>	Translocação característica do DFSP t(17;22)(q22;q13).....	8
<b>Figura 8</b>	Cariótipos (esquerda) e FISH de um dermatofibrossarcoma em adulto.....	10
<b>Figura 9</b>	Rearranjo cromossômico 17;22 no dermatofibrossarcoma protuberans.....	11
<b>Figura 10</b>	Via apoptótica mitocondrial.....	22
<b>Figura 11</b>	Foto do TMA em duplicata.....	28
<b>Figura 12</b>	Spot de TMA com IHM positiva para CD34.....	32
<b>Figura 13</b>	Análise da positividade pelo software Aperio.....	32

<b>Figura 14</b>	Boxplot MMP1 e recorrência. $p=0,874$ .....	43
<b>Figura 15</b>	Boxplot MMP9 e recorrência. $p=0,598$ .....	44
<b>Figura 16</b>	Boxplot MMP14 e recorrência. $p=0,891$ .....	45
<b>Figura 17</b>	Boxplot Bcl-2 e recorrência. $p=0,306$ .....	46
<b>Figura 18</b>	Boxplot FAS e recorrência. $p=0,331$ .....	47
<b>Figura 19</b>	Boxplot FASL e recorrência. $p=0,265$ .....	48
<b>Figura 20</b>	Boxplot Caspase 8 e recorrência. $p=0,410$ .....	49
<b>Figura 21</b>	Boxplot Caspase 9 e recorrência. $p=0,484$ .....	50
<b>Figura 22</b>	Boxplot Apaf1 e recorrência. $p=0,5$ .....	51
<b>Figura 23</b>	Boxplot BAX e recorrência. $p=0,716$ .....	52
<b>Figura 24</b>	Boxplot MMP1 e recorrência. $p=0,87$ .....	53
<b>Figura 25</b>	Boxplot MMP1 e recorrência. $p=0,09$ .....	54
<b>Figura 26</b>	Boxplot MMP1 e recorrência. $p= 0,406$ .....	56
<b>Figura 27</b>	Boxplot MMP9 e recorrência. $p= 0,40$ .....	57
<b>Figura 28</b>	Boxplot MMP14 e recorrência. $p= 0,691$ .....	58
<b>Figura 29</b>	Boxplot Bcl-2 e recorrência. $p= 0,088$ .....	59

<b>Figura 30</b>	Boxplot FAS e recorrência. $p= 0,972$ .....	60
<b>Figura 31</b>	Boxplot FASL e recorrência. $p= 0,048$ .....	61
<b>Figura 32</b>	Boxplot Bcl-2 e recorrência. $p= 0,063$ .....	62
<b>Figura 33</b>	Boxplot Caspase 9 e recorrência. $p= 0,446$ .....	63
<b>Figura 34</b>	Boxplot APAF-1 e recorrência. $p= 0,836$ .....	64
<b>Figura 35</b>	Boxplot BAX e recorrência. $p= 0,289$ .....	65
<b>Figura 36</b>	Boxplot MIB1 e recorrência. $p= 0,235$ .....	66
<b>Figura 37</b>	Boxplot CD34 e recorrência. $p= 0,403$ .....	67
<b>Figura 38</b>	Diferença de representação das margens cirúrgicas.....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Análise das margens por técnica micrográfica de Mohs.....	13
<b>Tabela 2</b>	Características clínicas e epidemiológicas dos 61 pacientes com dermatofibrossarcoma.....	37
<b>Tabela 3</b>	Localização do tumor e recorrência tumoral.....	39
<b>Tabela 4</b>	Relação da recorrência tumoral e status antes da admissão ao HACC.....	39
<b>Tabela 5</b>	Margens de pelo menos 3 cm e recorrência tumoral.....	40
<b>Tabela 6</b>	Margens cirúrgicas de pelo menos 2 cm e recorrência tumoral.....	40
<b>Tabela 7</b>	Margens cirúrgicas e recorrência tumoral.....	41
<b>Tabela 8</b>	Relação do status do FISH e recorrência tumoral.....	41
<b>Tabela 9</b>	Positividade dos marcadores: média, mediana, variação e desvio padrão.....	42
<b>Tabela 10</b>	O teste de Mann-Whitney não mostrou significância estatística entre as amostras de pacientes com recidiva e sem recidiva.....	42
<b>Tabela 11</b>	O teste de Mann-Whitney mostrou significância estatística apenas em relação ao marcador FASL comparando as amostras de pacientes com recidiva e sem recidiva.....	55

<b>Tabela 12</b> Status do FISH e recorrência tumoral em pacientes tratados com margens menores que 3 cm.....	68
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>APAF1</b>	Apoptotic protease activating factor 1
<b>BAX</b>	Bcl-2-associated X protein
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>COL-1<math>\alpha</math>1</b>	Colágeno 1 alfa 1
<b>CCPDMA</b>	Complete Circumferential and Peripheral Deep-margin Assessment
<b>CD34</b>	antígeno das células hematopoiéticas humanas
<b>DFSP</b>	Dermatofibrossarcoma protuberans
<b>DFSP</b>	Dermatofibrossarcoma protuberans - fibrossarcoma
<b>FAS</b>	apoptosis antigen 1
<b>FASL</b>	apoptosis antigen 1 ligand
<b>FISH</b>	fluorescence in situ hybridization
<b>HACC</b>	Hospital do Câncer Antônio Cândido Camargo
<b>MIB1</b>	antigen protein Ki67
<b>MMP1</b>	metaloproteinase 1
<b>MMP14</b>	metaloproteinase 14
<b>MMP9</b>	metaloproteinase 9
<b>PDGF</b>	platelet-derived growth factor
<b>PDGFR</b>	platelet-derived growth factor receptor
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>TMA</b>	Tissue Micro Array

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Histologia e Imunoistoquímica .....	2
1.2	Transformação Fibrossarcomatosa .....	6
1.3	Genética e Patogenia .....	7
1.4	Tratamento Cirúrgico .....	12
1.5	Radioterapia .....	15
1.6	Tratamento Sistêmico .....	16
1.7	Marcadores de proliferação celular, apoptose e invasividade .....	17
1.7.1	Marcador de proliferação Ki67 .....	17
1.7.2	Metaloproteinases .....	18
1.7.3	Apoptose .....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3.1	População de Estudo e Tamanho da Amostra .....	26
3.2	Critérios de Inclusão .....	26
3.3	Critérios de Exclusão .....	26
3.4	Técnicas utilizadas no Departamento de Anatomia Patológica .....	27
3.4.1	Confecção do TMA .....	27
3.4.2	Leitura das Lâminas de Imunoistoquímica .....	30
3.4.3	Interpretação das Reações Imunoistoquímicas .....	31
3.4.4	Estudo da Fusão de COL-1A1/ PDGF- $\beta$ .....	33
3.4.5	Hibridização in situ fluorescente (FISH) .....	33
3.5	Análise estatística .....	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
4.1	Fatores Relacionados com a Recorrência após Tratamento no A.C. Camargo .....	38

4.1.1	Gênero.....	38
4.1.2	Localização do tumor .....	38
4.2	Recorrência do Tumor antes da Admissão no A. C. Camargo .....	39
4.2.1	Margens cirúrgicas 3 cm ou mais .....	40
4.2.2	Margens 2 cm.....	40
4.2.3	Margens cirúrgicas categorizadas .....	40
4.3	Recorrência em Relação Ao Marcadores .....	43
4.3.1	Marcadores de invasividade.....	43
4.4	Resultados considerando pacientes tratados com margens de segurança menores que 3 cm .....	55
4.4.1	Marcadores de invasividade.....	56
4.4.2	Marcadores de apoptose.....	59
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
5.1	Gênero.....	70
5.2	Margens cirúrgicas .....	70
5.3	Radioterapia .....	73
5.4	Marcadores de invasividade.....	75
5.5	Marcadores de apoptose.....	75
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>

## **ANEXO**

### **Anexo 1** Protocolo de Coleta de Dados para Pacientes com Dermatofibrossarcoma Protuberans (DFSP)

## 1 INTRODUÇÃO

O dermatofibrossarcoma protuberans (DFSP) é um tumor raro de origem mesenquimal que se origina na pele. Corresponde a 1% de todos os sarcomas e 0,1% das neoplasias malignas (RATNER et al. 1997). É classificado como um sarcoma de baixo grau que raramente metastiza, embora seja localmente muito invasivo e com altas taxas de recorrência local. Pacientes com DFSP podem apresentar até 60% de recorrência após tratamento cirúrgico (BOWNE et al. 2000; FIELDS et al. 2011). A incidência deste tumor é de 4,2 casos por milhão de habitantes, com frequências semelhantes entre homens e mulheres, acometendo principalmente adultos entre 30 e 50 anos (CRISCIONE et al. 2007).

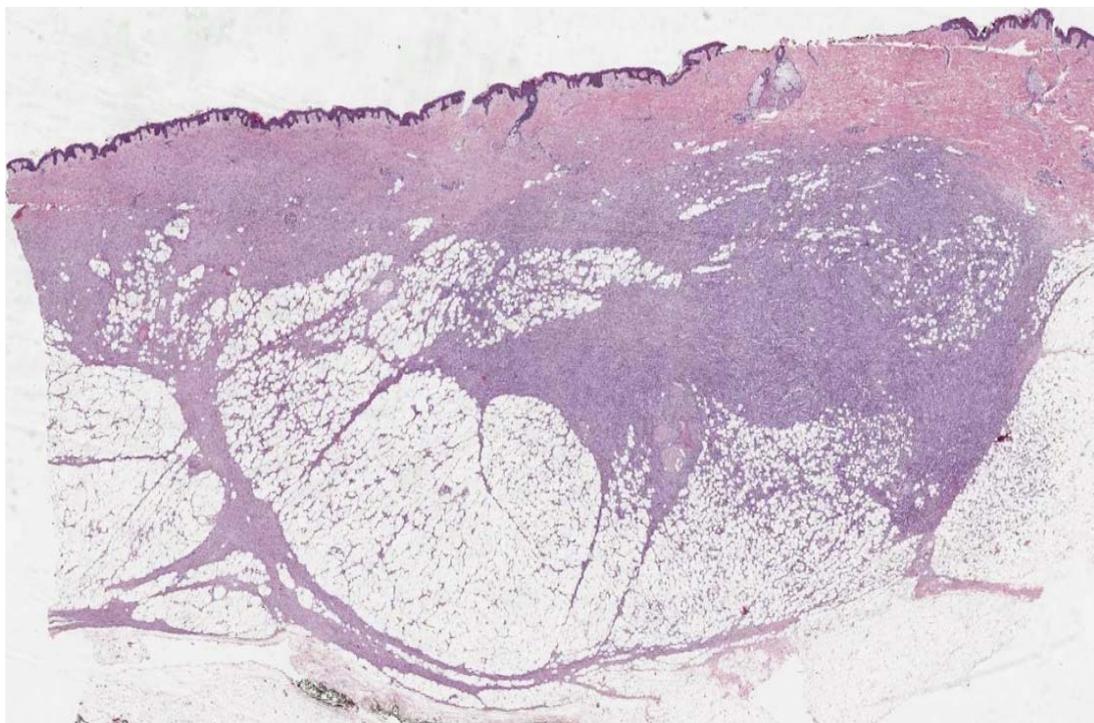
Clinicamente manifesta-se como placas e nódulos protuberantes avermelhados de crescimento lento, podendo ainda apresentar áreas atróficas ou ulceradas. Comumente, é erroneamente diagnosticado como quelóide, e o diagnóstico definitivo pode ocorrer anos após a apresentação inicial. A localização mais acometida é o tronco, 42% dos casos, seguido dos membros em 34% (JOHNSON-JAHANGIR e RATNER 2011).

Historicamente, esta neoplasia foi descrita pela primeira vez por Taylor em 1891 como um tumor sarcomatoso de aspecto queloidiano. Darier and Fernand, em 1924, o descreveram como dermatofibroma progressivo e recorrente, mas Hoffman que o nominou ao relatar três casos, em 1925

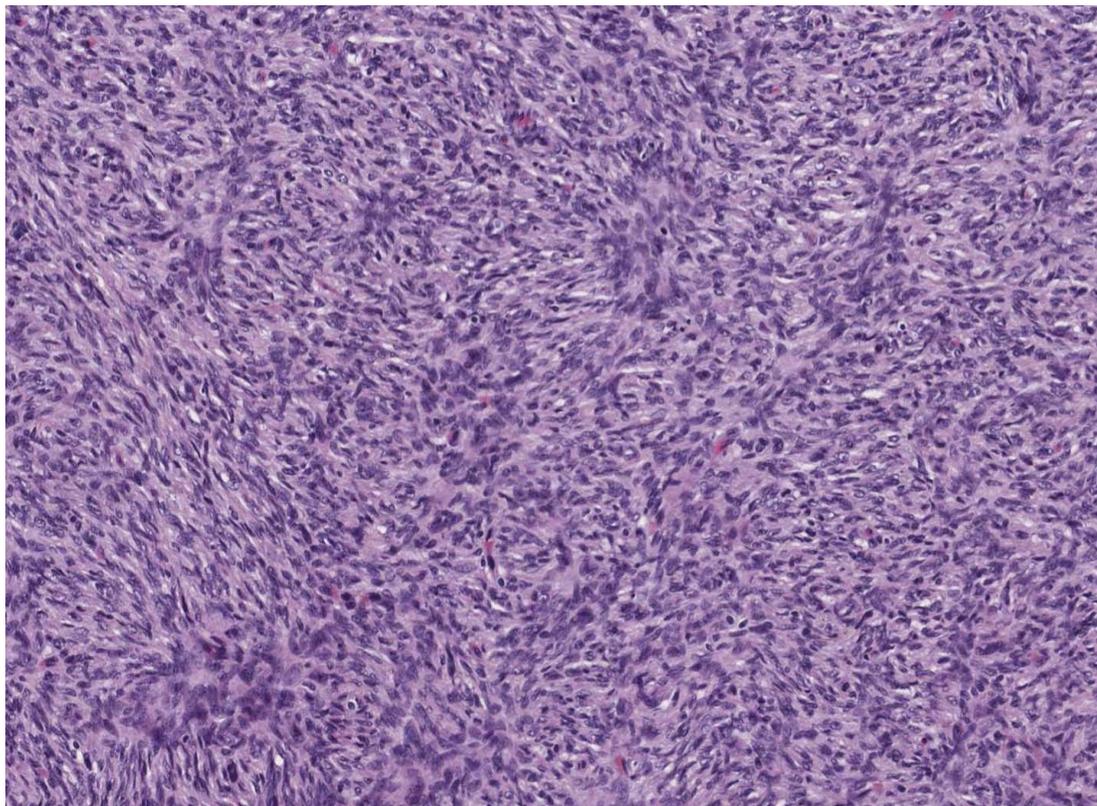
(GOLDEMBERG et al. 1994; MENDENHALL et al. 2004; MACEDO et al. 2008).

## 1.1 HISTOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA

O DFSP é constituído por células fusiformes dispostas em um padrão irregular estoriforme. A atipia celular é de leve a moderada, podendo haver mitoses.



**Figura 1** – Microfotografia. Foto panorâmica de lâmina de DFSP. (HE 2x Aperio)



**Figura 2** – Microfotografia. Padrão estoriforme do DFSP. (HE 40x Aperio)

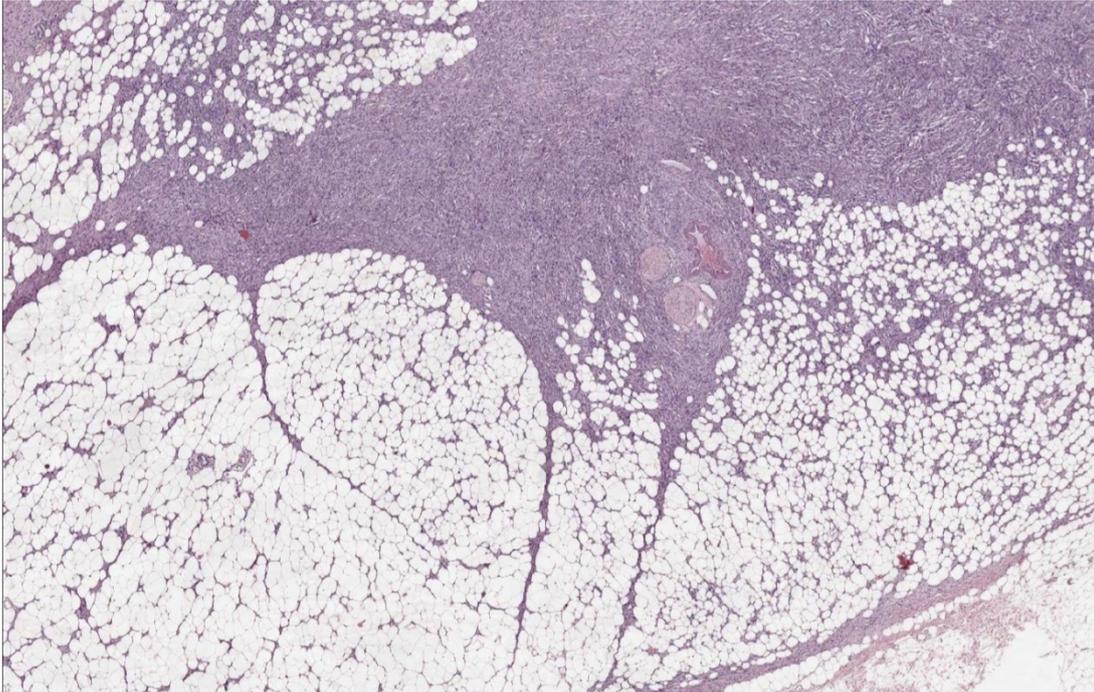
O principal marcador imunohistoquímico utilizado no diagnóstico do DFSP é o CD34. Este é uma proteína com 110-kD transmembrana conhecida como antígeno das células hematopoiéticas humanas. Este antígeno é identificado em células endoteliais e os tumores derivados destas. Na pele este antígeno tem sido identificado em células dendríticas da derme reticular e em células fusiformes próximos a glândulas écrinas (FINA et al. 1990; TRAWEEK et al. 1991; NICKOLOFF 1991). O Fator XIIIa, fator estabilizador de fibrina, é uma proteína tetramérica que possui uma função importante na coagulação. Esta proteína encontra-se expressa com frequência nos dermatofibromas. O DFSP geralmente possui imunohistoquímica positiva para o CD34 e negativa para o Fator XIIIa, o que

ajuda à diferenciá-lo do dermatofibroma (GOLDBLUM et al. 1997). Nos casos em que há transformação fibrossarcomatosa, há uma tendência à negatividade do CD34 (MENTZEL et al. 1998).

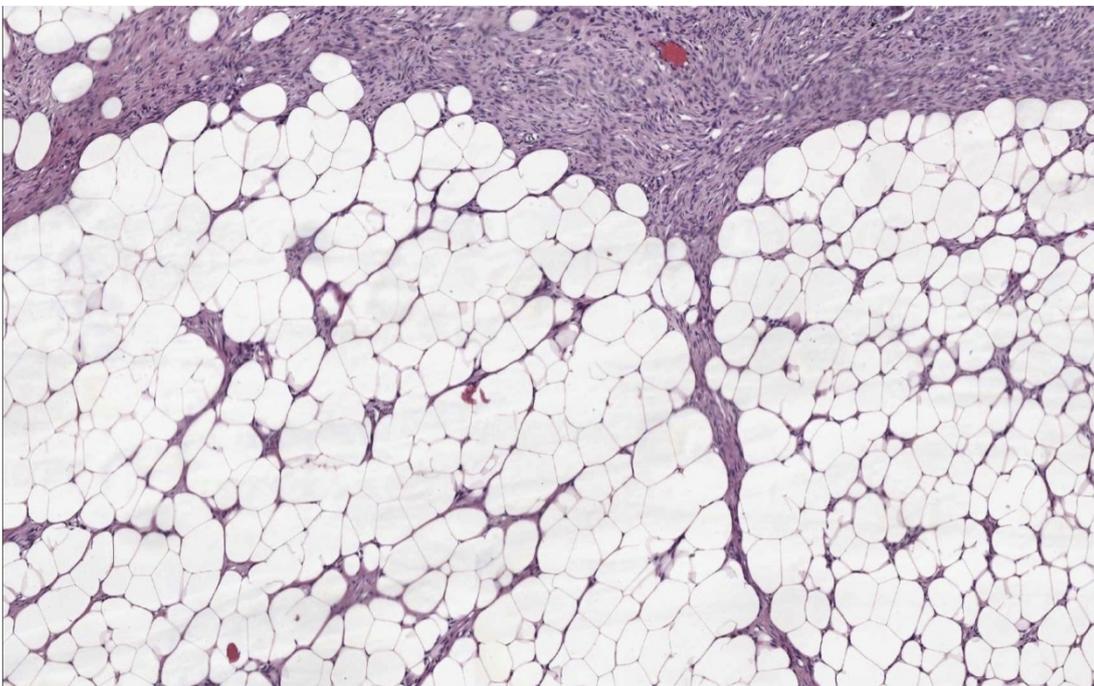


**Figura 3** – Microfotografia - Imunoistoquímica positiva para CD34 no DFSP  
Diâmetro do spot 1mm

O DFSP possui um padrão de crescimento imprevisível extensivamente e profundamente devido às projeções infiltrativas que se intercalam entre lóbulos de gordura. Por este motivo, a ressecção simples apresenta altas taxas de recidiva.



**Figura 4** - Microfotografia DFSP HE, padrão de crescimento com projeções do tumor, preservando feixe vasculho-nervoso. (HE 15x Aperio)

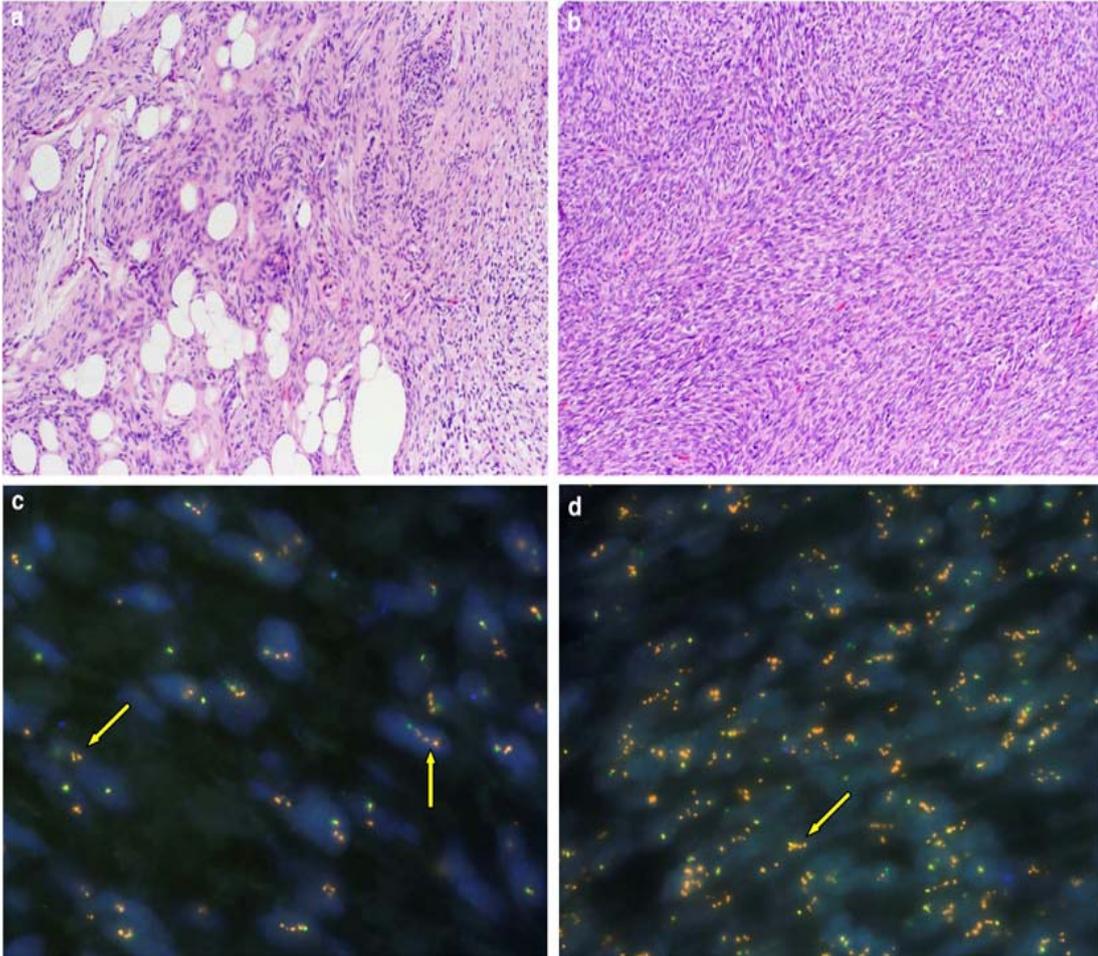


**Figura 5** - Padrão de crescimento do DFSP infiltrando o tecido adiposo. (HE 20x Aperio)

## 1.2 TRANSFORMAÇÃO FIBROSSARCOMATOSA

Cerca de 10 a 15% dos pacientes com dermatofibrossarcoma apresentam transformação fibrossarcomatosa, que é histologicamente caracterizado pelo aumento de celularidade, da atipia celular e de mitoses (BOWNE et al. 2000; ABBOTT et al. 2006). Nestes caso há uma alteração no padrão estoriforme que passa a apresentar áreas que formam fascículos (padrão herringbone) (ABBOTT et al. 2006). Após esta transformação existe uma tendência a negatização do marcador CD34 (SATO et al. 1995). Clinicamente, estes pacientes tendem a apresentar maior incidência de metástases que o DFSP clássico e costumam ocorrer em pacientes de mais idade e após múltiplas recidivas (CONNELLY e EVANS 1992).

Os tumores que apresentam transformação fibrossarcomatosa apresentam diferenças gênicas em relação ao DFSP clássico como amplificação no número de cópias do gene mutado COL1A1-PDGFB, desenvolvimento de instabilidades microssatélites e mutação no gene p53 (LINN et al. 2003; TAKAHIRA et al. 2004; ABBOTT et al. 2006; MACARENCO et al. 2008).



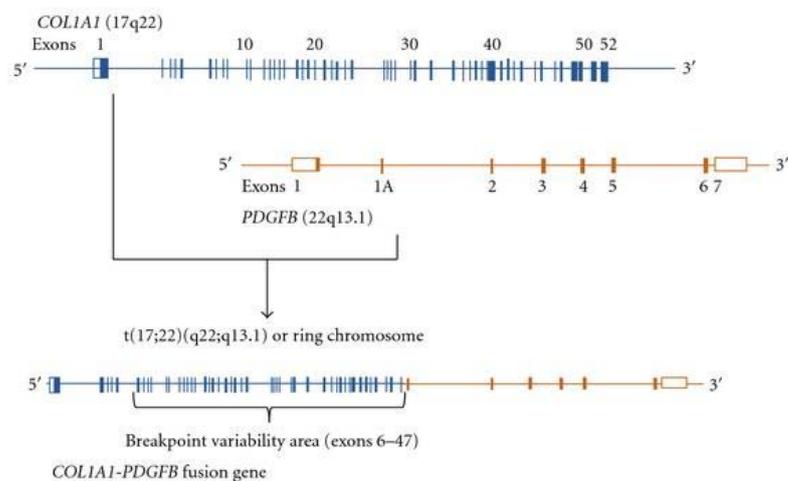
Fonte: ABBOTT et al. (2006)

**Figura 6** - Diferença histológica e do número de cópias do gene mutado - (a) Dermatofibrossarcoma protuberans clássico aumento (HE 100x) (b) Mesmo tumor porém mostrando área com transformação fibrossarcomatosa com formação de fascículos “padrão herringbone” (espinha de peixe), aumento de celularidade e mitose (HE 100x) (c) FISH mostrando células com 1 a 3 cópias do gene mutado COL1A1-PDGFB (aumento 1000x). (d) FISH do componente fibrossarcomatoso do tumor mostrando células com 3 a 7 cópias do gene mutado COL1A1-PDGFB (aumento 1000x).

### 1.3 GENÉTICA E PATOGENIA

A primeira análise citogenética do DFSP data de 1990 por BRIDGE et al. (1990) e MANDAHL et al. (1990) que descreveram cromossomos supranumerários em anel. Estes cromossomos mutados podem apresentar

tanto a forma de anel, mais comum em pacientes adultos, quanto a forma linear, mais frequente em pacientes mais jovens. Esta mutação do DFSP é caracterizada pela presença de alteração citogenética específica envolvendo os cromossomos 17 e 22,  $t(17;22)(q22;q13)$ , resultando, habitualmente, em anomalia cromossômica com fusão do gene do colágeno tipo-1 alfa-1 (COL1A1) do cromossomo 17 com o gene do fator de crescimento derivado de plaquetas cadeia  $\beta$  do cromossomo 22 (PDGF- $\beta$ ) (BRIDGE et al. 1990; MAND AHL et al 1990). Esta translocação ocorre em 90% do dermatofibrossarcomas e pode ser detectada por Imunofluorescência por Hibridização In Situ (FISH) ou Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) (WANG et al. 1999; SZOLLOSI et al. 2007; PATEL et al. 2008).



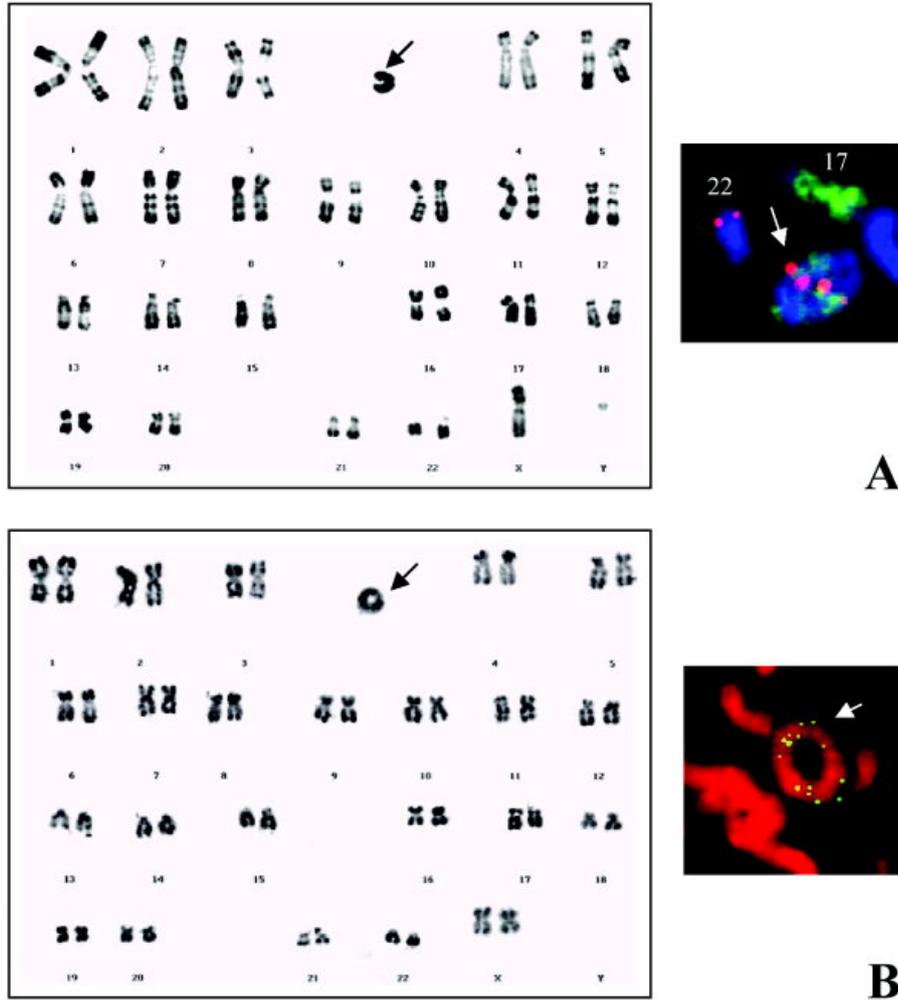
Fonte: RUTKOWSKI et al. (2011)

**Figura 7** – Translocação característica do DFSP  $t(17;22)(q22;q13)$

A proteína PDGF- $\beta$  é um produto do gene *c-sis*, um dos primeiros protooncogenes descritos. A proteína COL1A1 é a proteína mais abundante do corpo humano. O DFSP é o único tumor em que ocorre a alteração dos genes que codificam estas proteínas. A família PDGF é composta por glicoproteínas diméricas que regulam o crescimento e divisão celular. O PDGF é composto duas cadeias A (AA), duas cadeias B (BB) ou uma combinação de ambas (AB). Estas proteínas são potentes mitógenos principalmente de células de origem mesenquimal como células musculares lisas. Em humanos, a rede de sinalização destas proteínas consistem em quatro ligantes (PDGFA, PDGFB, PDGFC e PDGFD) e dois receptores (PDGF- $\alpha$  e PDGF- $\beta$ ) (HANNINK e DONOGHUE 1989; HELDIN 1992).

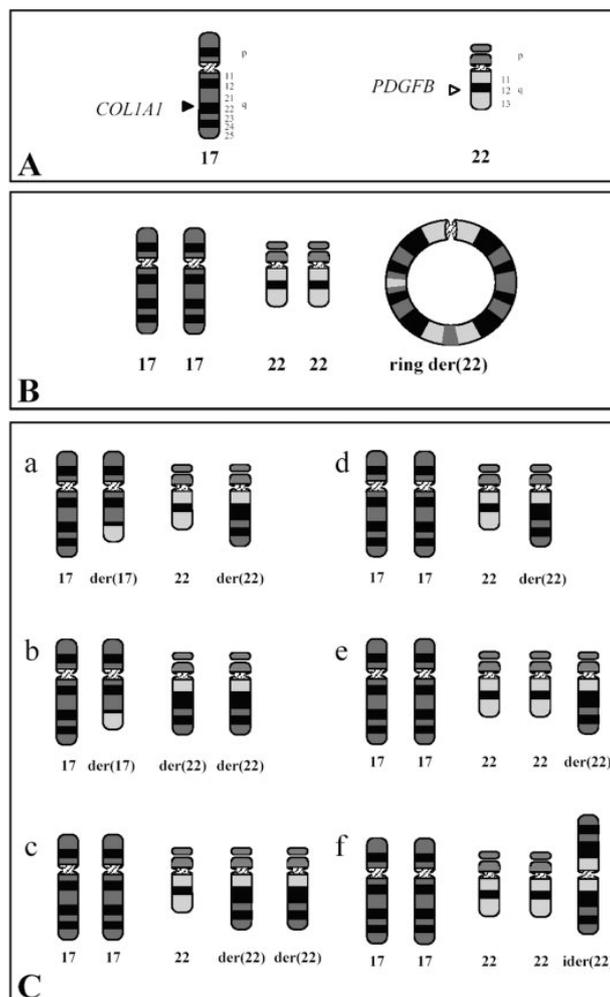
O receptor PDGF é classificado como um receptor tirosina-quinase. O receptor  $\alpha$  liga-se ao PDGF-AA, PDGF-BB e PDGF-AB enquanto o receptor  $\beta$  pode se ligar ao PDGF-BB e PDGF-AB.

A função exata da proteína COL1A1-PDGFB no desenvolvimento do DFSP ainda não é clara. Esta proteína estimula a produção de PDGF-BB ativando continuamente o receptor PDGF $\beta$ , levando-o a uma superexpressão e estímulo oncogênico devido à uma ação autócrina e parácrina. Por se tratar de um receptor tirosina-quinase, em casos selecionados tem sido utilizado o mesilato de imatinib para o tratamento deste tumor (RUBIN et al. 2002; O'BRYAN e RATNER 2011).



Fonte: SIRVENT et al. (2003)

**Figura 8** - Cariótipos (esquerda) e FISH de um dermatofibrossarcoma em adulto. (A) e em um lipossarcoma bem diferenciado (B). Ambos tumores são caracterizados por cromossomos em anéis supranumerários (setas). A análise por FISH ilustra que o anel cromossômico tem origem em cromossomo 17 (verde) e 22 (vermelho).



Fonte: SIRVENT et al. (2003)

**Figura 9** - Rearranjo cromossômico 17;22 no dermatofibrossarcoma protuberans. **A**: diagrama com cromossomos 17;22 normais, com indicação dos locais dos genes *COL1A1* e *PDGFB*, respectivamente. **B-C**: Representação esquemática da anormalidade dos cromossomos 17 e 22 no DFSP. **B**: Anormalidade do DFSP no adulto: anel cromossômico derivado do cromossomo 22 contendo sequências do 17q22-qter e 22q10-q13.1 em adição ao par cromossômico normal 17 e 22. **C**: Representação da anormalidade em DFSP em crianças, ocasionalmente descrita em adultos.

## 1.4 TRATAMENTO CIRÚRGICO

O tratamento cirúrgico do DFSP apresenta muitas controvérsias. As principais técnicas utilizadas são a ressecção com margens amplas (geralmente 3cm), utilizando-se ou não a congelação, cirurgia de Mohs, cirurgia com análise 3D (*Complete Circumferential and Peripheral Deep-margin Assessment (CCPDMA)*) (HÄFNER et al. 2008; FARMA et al. 2010).

A ressecção ampla utilizando 3 cm de margem de segurança tem sido o padrão no tratamento do DFSP, porém, esta técnica depende de uma avaliação adequada dessas margens, o que nem sempre ocorre, resultando em altos índices de recidiva. Quando a análise das margens é realizada com cortes transversais, existe um alto risco de um resultado falso negativo, pois não há uma avaliação completa, e sim uma amostragem que corresponde a menos que 1% da circunferência total do tumor (SONDAK et al. 1999). Por isso, apesar de margens livres, este método pode levar de 17% a 60% de recidivas. A avaliação das margens pode ser realizada no intraoperatório ou pós-operatório (HÄFNER et al. 2008; FARMA et al. 2010).

Avaliando as margens pela técnica de Mohs, RATNER et al. (1997) encontrou 15% de margens positivas quando utilizada margens de 3 cm para ressecção, e 3% quando utilizado margem de 6cm (RATNER et al. 1997). Isto é um reflexo do padrão irregular de crescimento do tumor, que pode ser comparado à tentáculos, que se projetam distantemente do tumor em permeio a tecido adiposo, músculo, colágeno e fáscia, mimetizando tecidos histologicamente normais (RATNER et al. 1997; FARMA et al. 2010).

**Tabela 1** - Análise das margens por técnica micrográfica de Mohs

Margem Macroscópica	Positiva	Recorrência
1 cm	70%	N/A
2 cm	40%	41%
3 cm	22%	24%
4 cm	15%	11-20%
5cm	9%	N/A
6cm	3%	N/A

**Fonte:** RATNER et al. (1997)

A cirurgia de Mohs descrita por Frederic E. Mohs e Tromovitch tem se mostrado uma boa alternativa para o tratamento deste tumor (MOHS et al. 1941; TROMOVITCH et al. 1974). Com esta técnica os índices de recidiva tem sido mais baixos que a ressecção ampla. RATNER et al. (1997) demonstraram recorrência de 1 caso (2%) em 58 casos operados. Separando os pacientes entre recorrentes e primeiro tratamento, a recorrência foi 4,8% e 0%, respectivamente. Um problema relacionado à técnica de Mohs é a formação do profissional complexa, não sendo frequente cirurgiões que realizam esta técnica em nosso meio. Outra crítica é que quando há mínima quantidade de células de DFSP, estas são difíceis de serem vistas usando a técnica de Mohs, ficando mais fácil na lâmina preparada com parafina, situação em que pode ser utilizada também a imunistoquímica para identificação das células neoplásicas e avaliação das margens, diferenciando células tumorais fusiformes das células do tecido conjuntivo (MASSEY et al. 1998; HÄFNER et al. 2008). Outras

desvantagens desta técnica são o tempo maior para avaliação das margens e a dificuldade em manejar grandes espécimes (HÄFNER et al. 2008).

Em alternativa à cirurgia de Mohs, existe a cirurgia com análise periférica circunferencial e profunda completa das margens (CCPDMA). O princípio é semelhante à técnica de Mohs, porém nesta o tumor é ressecado com uma margem menor que a tradicional de 3 cm. A peça é processada em parafina e as margens mapeadas, podendo-se utilizar a imunohistoquímica na avaliação (HÄFNER et al. 2008). Nos casos em que a análise em parafina revela margem positiva, é realizado nova ampliação. Esta técnica também possui baixas taxas de recidivas, tendo a desvantagem em relação à técnica de Mohs que o paciente pode ter que ser submetido a mais de um procedimento cirúrgico. Uma vantagem deste método é que ele permite uma qualidade melhor da lâmina tornando a avaliação das margens mais acurada. Com esta técnica, HÄFNER et al. (2008) obteve uma recorrência apenas em 70 pacientes, com sobrevida livre de doença em 5 e 10 anos 100% e 98,6% respectivamente, e sem mortes decorrente da doença. Esta única recidiva ocorreu após 62 meses de seguimento e não foi confirmada com certeza pois a parafina não foi suficiente para diferenciar as células se eram tumorais ou cicatriciais, e além disto, este tumor era CD34 negativo, não sendo a imunohistoquímica útil nesta diferenciação (HÄFNER et al. 2008). Um ponto desfavorável desta técnica é que pode ser necessário cirurgias sequenciais até que seja obtido margens livres. FARMA et al. (2010) relataram que pacientes submetidos ao tratamento com esta técnica necessitaram de 1 a 4 excisões, com margem média de 2cm, variando de

0,5 a 3cm. Em 113 pacientes a margem inicial de ressecção foi entre 1 e 2 cm, destes, 84% tiveram um excisão apenas, 13% duas excisões, 2% 3 excisões e 1% 4 excisões.

## **1.5 RADIOTERAPIA**

O uso da radioterapia é controverso no tratamento do DFSP devido ao número limitado de estudos e à raridade da doença. A radioterapia pode ser utilizada no tratamento do DFSP combinada à cirurgia ou de forma isolada. Geralmente está indicada em casos em que há margem comprometida por tumor ou exígua. Em estudo, BALLO et al. (1998) analisaram 19 casos. Destes 6 apresentavam margens comprometidas por DFSP microscopicamente e um com margem comprometida por doença macroscópica. Em 10 anos houve 95% de controle local, a única recidiva ocorreu no paciente com doença macroscópica (BALLO et al. 1998). Em outra série, SUIT et al. (1996) avaliaram 18 pacientes com DFSP, sendo que 15 pacientes receberam tratamento combinado com cirurgia e radioterapia e 3 apenas radioterapia. O controle local em 10 anos foi de 88%. Entre os 15 pacientes que receberam o tratamento combinado, 3 recidivaram, sendo que estes mesmos apresentavam ressecção com margens microscópicas comprometidas por DFSP. O pacientes que receberam radioterapia de forma isolada encontravam-se sem evidência de doença após 85, 106 e 108 meses respectivamente (SUIT et al.1996).

## 1.6 TRATAMENTO SISTÊMICO

A quimioterapia convencional não tem grande utilidade no tratamento do DFSP. As principais indicações são para os casos irressecáveis, metastáticos e em que a cirurgia poderia gerar mutilação para o paciente. Dentre as drogas testadas estão o Methotrexate, Vinblastina, Vincristina, Dactinomicina, ciclofosfamida e doxorrubicina, porém os relatos são escassos e os resultados desanimadores (MENDOZA et al. 1970; LEMM et al. 2009).

Atualmente, a principal droga utilizada no tratamento do DFSP é o mesilato de imatinib. O imatinib é um inibidor da tirosina-quinase presente no receptor PDGFB que está superexpresso no DFSP. Os pacientes que possuem a translocação do gene COLA1A1-PDGFB que causa esta superexpressão podem se beneficiar do tratamento com imatinib, pois este tem uma ação inibitória no PDGFBR. Em uma série de 10 pacientes, 8 apresentavam a translocação e tiveram evidência de resposta ao imatinib à dose de 800mg dia, sendo 4 respostas clinicamente completas e duas confirmadas histologicamente. Os pacientes sem a translocação tendem a não responder ao imatinib, logo é adequado pesquisá-la antes do tratamento (MCARTHUR et al. 2005). Em um estudo fase II com 24 pacientes com translocação confirmada, foram comparadas as doses de 400mg ou 800mg dia, a dose não interferiu no grau de resposta. Onze pacientes (46%) apresentaram resposta parcial. Não houve resposta completa (RUTKOWSKI et al. 2010).

Em tumores localmente avançados, o imatinib pode ser utilizado de forma neoadjuvante (KÉROB et al. 2010). Em uma análise de 4 casos que utilizaram o imatinib antes da cirurgia micrográfica de Mohs, houve uma redução média no volume tumoral de 36,9%. A resposta clínica foi acompanhada de resposta histológica, com diminuição da celularidade. Em seguimento de 4 anos, não houve recidiva nestes pacientes (HAN et al. 2009).

## **1.7 MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR, APOPTOSE E INVASIVIDADE.**

### **1.7.1 Marcador de proliferação Ki67**

A proteína Ki67 é um marcador de proliferação celular. Possui 395 kD e sabe-se estar intimamente relacionada às células em ciclo celular. Sua detecção é possível no final da fase G1, aumenta nas fases S, G2 e mitose, caindo rapidamente após esta. Durante a mitose está intimamente ligada à cromátide. O DNA que a codifica encontra-se em estado de difícil identificação devido ao grande peso molecular da proteína Ki67 (HALL et al. 1990; SAWHNEY e HALL 1992; DUPRAT NETO 1997). O método de análise do Ki67 pode atualmente ser realizado em material parafinado, através de estudo imunoistoquímico. Na literatura há um estudo relacionando o DFSP e a expressão da proteína Ki67 (TERRIER-LACOMBE et al. 2003). Neste estudo com apenas 19 casos de DFSP, houve apenas a relação de que a proteína está expressa em menos de 1% das células, além

do que pelo pequeno número de casos e recidivas não foi possível relacionar a expressão da proteína e o prognóstico. Outro estudo tenta diferenciar Dermatofibroma e Dermatofibrossarcoma avaliando o índice de proliferação celular, a expressão de Ki67 mostrou ser maior no sarcoma mas não relacionou com prognóstico (HSI e NICKOLOFF 1996).

### **1.7.2 Metaloproteinases**

As metaloproteinases (MMPs) pertencem à família de endopeptidases dependentes de zinco e estão envolvidas na degradação e remodelamento 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 collagenases 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; TURPEENIEMI-HUJANEN et al. 2005). Outras MMPs são: estromelina-1 (MMP-3) e estromelina-2 (MMP-10), estromelina-3 (MMP-11) e metaloelastase (MMP-12). Principalmente expressa em células epiteliais tem-se a matrilina (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). Foram estudadas as MMP 1, 2, 9 e 14 pois estas são sintetizadas em fibroblastos dérmicos. Além disto, o fator de crescimento  $\beta$  derivado de plaquetas PDGF- $\beta$  que está super-expresso em DFSP, parece estar relacionado a sua invasão e metastatização, regula também as MMP 1, 3 e 9. Estudo de KIM et al. (2007) mostrou a correlação positiva da estromelina 3 presente em 23 de 23 casos de dermatofibroma, enquanto que no dermatofibrossarcoma foi encontrada em apenas 1 de 17 casos. A expressão de metaloproteinases foi estudada por WEINRACH et al. (2004) para diferenciar o DFSP e o dermatofibroma (fibrohistiocitoma benigno). Ambos trabalhos mostraram que as MMPs não encontram-se superexpressas no DFSP, e na análise de WEINRACH et al. (2004) os dermatofibromas apresentam expressão aumentada das MMP-14 em 59% dos casos, MMP-2 em 47% dos casos, MMP-9 em 20% e MMP-1 em 13%. Este estudo concluiu que a MMP-2 por estar expressa na microvasculatura das regiões mais profundas e invasivas do DFSP, pode estar relacionada no processo de angiogênese, promovendo crescimento e invasão tumor. A MMP-11 também foi encontrada em DFSP.

Neste estudo foram estudados 330 casos de tumores cutâneos, nos quais foi visto que há expressão desta proteína em fibroblastos em torno do tumor mas pouco no interior deste, onde foi encontrado somente em 12,5% dos casos (THEWES et al. 1999).

### **1.7.3 Apoptose**

A apoptose é um mecanismo celular complexo e regulado onde células iniciam um processo de autodestruição, porém diferentemente da necrose, a membrana celular permanece intacta e não é liberado para o meio externo substâncias que poderiam levar injúria de células vizinhas ou iniciar um processo inflamatório. É dividida em três fases: inicial, efetora e de degradação. Até a fase efetora, o processo ainda é reversível. Este processo leva de 12 à 24 horas, dependendo do estímulo e do tipo de célula (YANG e KORSMEYER 1996; WHITE 1996; SUSIN et al. 1997).

A apoptose pode ser ativada por duas vias, a extrínseca que ocorre através de receptores de membrana e a intrínseca, que é dependente da mitocôndria. Há muitas vias de sinalização que levam a ativação da apoptose e isto também depende do tipo de célula e do estímulo que desencadeou o processo (KERR et al. 1994; CUMMINGS et al. 1997).

As caspases, bcl-2, bax, fas e fasl são proteínas que estão envolvidas na regulação da apoptose.

Existem cerca de 12 caspases conhecidas. Estas são proteases baseadas em cisteína que clivam outras proteínas em resíduos de aspartato. Estas são responsáveis pela fase inicial da apoptose, situação em que a

casca de capases é ativada e podem ser classificadas como iniciadoras e efetoras (SOINI et al. 1998).

- **Bcl-2**

A família Bcl-2 é um grupo de proteínas reguladoras da apoptose que podem promover ou inibir a morte celular. As proteínas deste grupo que inibem a apoptose são: bcl-2, bcl-xL, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1 e A1. Já as promotoras da apoptose são: bax, bak, bcl-xS, bad, bid, bik, e Hrk (SOINI et al. 1998; WESTPHAL et al. 2011).

- **APAF-1**

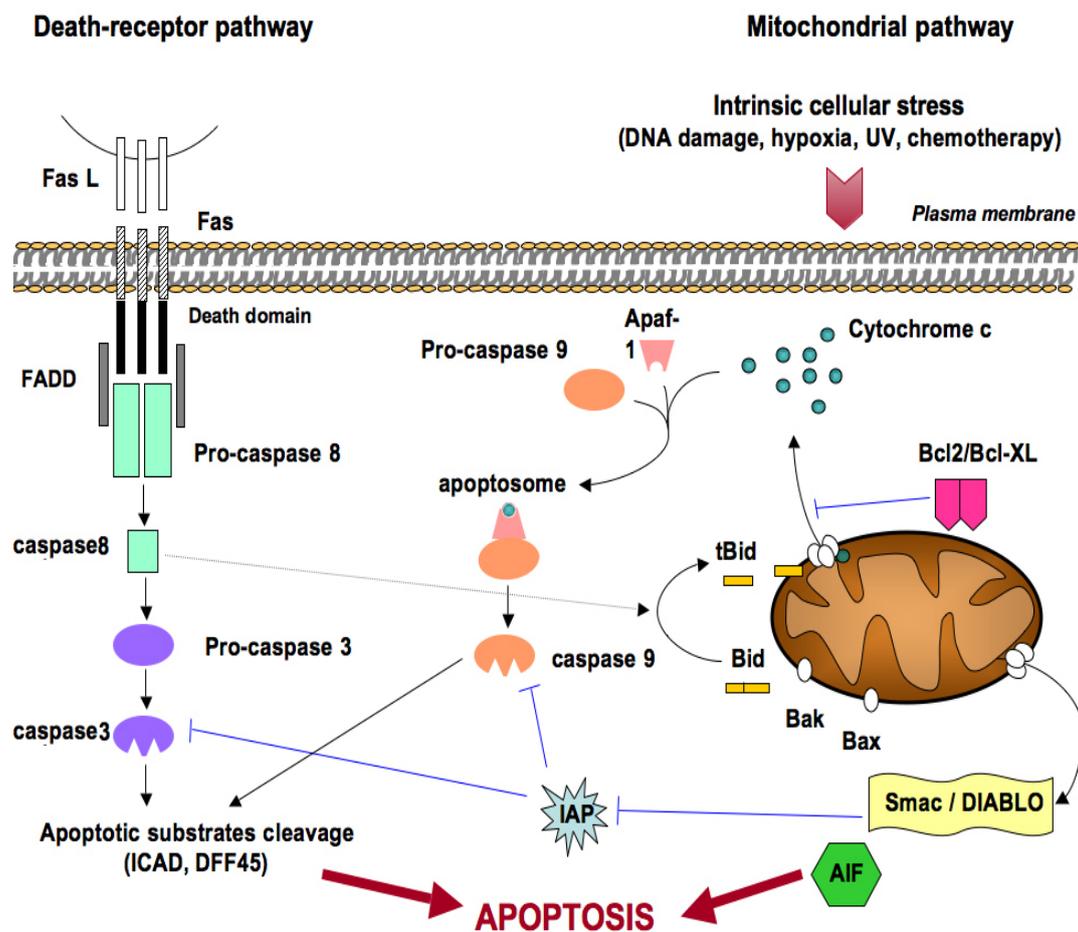
A APAF-1 (Apoptotic protease activating factor 1) é uma proteína pró-apoptótica que possui um domínio com afinidade à caspase. Sua função é promover uma ativação autocatalítica da caspase-9, iniciando o processo de apoptose (HAKEM et al. 1998).

- **Fas e FasL**

O receptor FAS, também conhecido como antígeno apoptótico 1 (APO 1), é uma proteína classificada como um receptor de morte celular. Encontra-se na superfície celular e é responsável pela via extrínseca da apoptose (SHEIKH e FORNACE 2000; WAJANT 2002).

O ligante FASL é uma proteína transmembrana que pertence a família TNF. Quando esta liga-se ao seu receptor, o FAS, leva a célula ao processo de apoptose. Esta interação entre o FAS/FASL tem uma função

importante na regulação do sistema imune e no desenvolvimento do câncer (INAZAWA et al. 1992).



Fonte: BELLANCE et al. (2009)

**Figura 10** – Via apoptótica mitocondrial. Via extrínseca: A morte celular pode ser induzida por ligantes (como o FasL) à receptores específicos (como Fas) localizados na membrana da célula. Via intrínseca (mitocondrial): A apoptose é desencadeada por estímulos intrínsecos e é dependente da mitocôndria

O receptor Fas possui um domínio intracelular onde FADD (Fas-associated death domain) pode ligar-se na presença do FasL, recrutando pro-caspase 8 para subsequente ativação em caspases 8. Isto induz a ativação da caspase 3, que cliva I-CAD (Caspase-activated DNase Inhibitor), inibidor da CAD (Caspase-activated DNase), que é liberada no núcleo da célula e cliva o DNA. Além disso, a caspase 8 cliva a proteína Bid resultando em uma proteína truncada (tBid) que, sobre dimerização da Bax ou Bad, causando a liberação do citocromo C da mitocôndria. O mecanismo pelo qual o Bax leva a permeabilização da membrana mitocondrial e subsequente liberação de fatores pró-apoptóticos ainda continua incerto. É proposto que o Bax interage com os poros, ou formam canais por auto-oligomerização. Isto leva a liberação do citocromo C e Smac/Diablo (Smac: second mitochondrial derived activator of caspase; Diablo: direct IAP binding protein with low pI), AIF (apoptosis inducing fator) e varias procaspases. O Bcl-2 inibe a liberação do citocromo C e AIF no citoplasma e evita a alteração da permeabilidade dos poros da membrana. No citoplasma, o citocromo C liga-se ao APAF-1 (apoptosis- protease- activating factor). Ambas proteínas formam o apoptossoma, que converte procaspase 9 em caspase 9. Isto resulta na diminuição das caspases efetoras. Smac/DIABLO ligam-se às IAP (inibidores da apoptose) e previne-as da inibição da caspase 9 e caspase 3. AIF tem uma função indireta na degradação cromossômica ao ativar a endonuclease G, a DNase que migra da mitocôndria para o núcleo durante a apoptose. Durante a apoptose não há fragmentação do DNA mitocondrial. (BELLANCE et al. 2009)

Fato interessante no DFSP é o baixo índice mitótico e por outro lado a agressividade e invasividade local. Sabemos que a translocação 7;22 leva a formação de uma proteína de fusão dos genes COL1A1 e PDGF- $\beta$ , esta levaria a estimulação do PDGFR- $\beta$  levando a ativação da proliferação celular e crescimento descontrolado (KONDAPALLI et al. 2005; NAKANISHI et al. 2007; SZOLLOSI et al. 2008; PATEL et al. 2008). Em estudos experimentais o tratamento com bloqueadores dos receptores de PDGF levam a intensa apoptose (SJÖBLOM et al. 2001). Os estudos de DFSP e proteínas da apoptose mostram que a expressão de Bcl-2 (inibidor da apoptose) em DFSP é variável, em 18 casos, foi visto expressão intensa em apenas 3 (SUSTER et al. 1998). Não há estudos na literatura sobre DFSP e Bax (indutor da apoptose), Caspases, APAF-1, Fas e Fas-ligante. Com os marcadores Caspase 8, Fas, Fas-ligante poderemos avaliar a via extrínseca da apoptose, enquanto com Caspase 9 e APAF-1 avaliaremos a via intrínseca (KUIDA et al. 1998; NAGATA et al. 1999).

## 2 OBJETIVOS

- 1 Avaliar as expressões imunoistoquímicas de marcadores de apoptose, proliferação celular e invasividade, e correlacionar com recidiva.
- 2 Estudo da fusão de COL-IA1/PDGF- $\beta$  por FISH (hibridização fluorescente in situ) e análise da frequência de translocação 17;22 na população em estudo. Correlacionar com a recidiva.
- 3 Avaliar as margens cirúrgicas utilizadas nas ressecções e avaliar o impacto na recorrência tumoral.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E TAMANHO DA AMOSTRA.**

Foram estudados retrospectivamente 61 pacientes com DFSP, atendidos no período entre 1978 a 2010 nos departamentos de Oncologia Cutânea e Cirurgia Pélvica do Hospital A. C. Camargo. O levantamento constou de revisão de prontuários de todos os pacientes para análise clínica após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

#### **3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Foram incluídos no estudo todos os casos de dermatofibrossarcomas confirmados após revisão diagnóstica por patologista especialista em sarcomas, que apresentassem blocos de parafina para a confecção do TMA e prontuários do Serviço de Arquivo Médico (SAME) condizentes com as características clínicas dos pacientes.

#### **3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Foram excluídos do estudo todos os casos não confirmados como DFSP após revisão histológica, assim como aqueles em que não foram encontrados os blocos de parafina e/ou clínica não condizente nos

prontuários do SAME (Anexo 1).

### **3.4 TÉCNICAS UTILIZADAS NO DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA**

Os espécimes estudados foram fixados em formalina a 10% em sua grande maioria em formol tamponado, segundo os procedimentos normais de técnica histológica da AFIP e estão armazenados em blocos de parafina. A partir deles, foram preparadas novas lâminas histológicas, coradas pela hematoxilina e eosina, em secções de 4 micrômetros.

#### **3.4.1 Confeção do TMA**

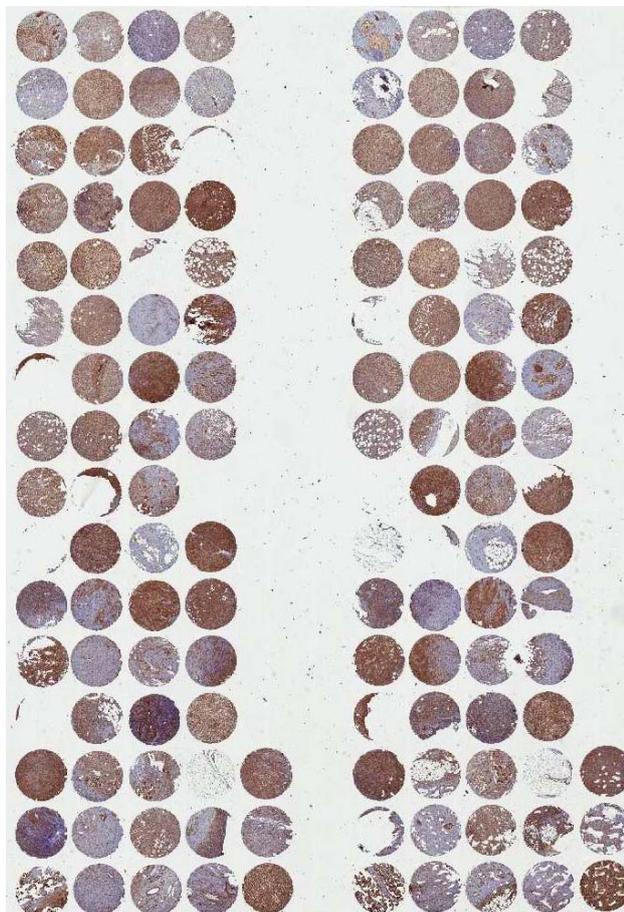
Os blocos de parafina foram analisados para determinarmos a melhor área para punção a fim de evitar amostras sem tumor para o TMA. Além disso o TMA foi realizado em duplicata para minimizar o risco de obter amostras inadequadas. Para a confecção do TMA foi utilizado o aparelho disponível no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo *tissue microarrayer* (Beecher Instruments®, Silver Spring, EUA)

As amostras foram puncionadas com punchs de 1 mm (TMA punch MP10-1 mm). Uma amostra de placenta foi utilizada na primeira posição do TMA para definir a ordem das amostras.

As lâminas com o TMA foram preparadas e realizado imunohistoquímica com cada marcador.

Para o mapeamento das amostras no TMA foi utilizado o Excel®

(Mac® – Microsoft® office 2011)



**Imunoistoquímica para MIB1, CD34, Metaloproteinases 1, 9, 14; Bcl-2, Bax, APAF-1, caspases 8 e 9, Fas e Fasl**

**Figura 11** - Foto do TMA em duplicata. Spots de 1mm

As imunoistoquímicas foram realizadas nas lâminas de TMA. Para cada reagente foi realizado protocolo padrão específico. Foram escolhidos marcadores de apoptose, invasividade e proliferação celular.

Os de invasividade foram Metaloproteinases 1, 9 e 14 e os de apoptose, Bcl-2, Bax, APAF-1, caspases 8 e 9, Fas e Fas-ligante. Além destes, foi pesquisado também o CD34, que é positivo na maioria dos dermatofibrossarcomas. A análise de proliferação celular foi analisada

através da expressão da proteína MIB1 (Ki67).

As reações de imunistoquímica foram realizadas nos cortes histológicos representativos da neoplasia e nas lâminas de TMA, pela técnica de complexo “Polimer detection System”.

As lâminas foram previamente revestidas por solução de 3-aminopropyltriethoxy-silano (APTS-Sigma® A3648) diluído a 4% em acetona.

Os cortes histológicos foram desparafinizados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol e submetidos à recuperação antigênica pelo calor com irradiação em banho-maria utilizando-se tampão citrato, pH 6.0 por 40 minutos, deixando mais 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol.) com três trocas de 5 minutos cada.

Após o bloqueio da peroxidase, também foi feito o bloqueio de proteína (DAKO® Protein Block Serum-Free) 20 minutos. A seguir, as lâminas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários:

- Ki67 (monoclonal de camundongo clone KiS5 Dako® Código M7187)
- CD34 (monoclonal de camundongo clone QBEnd10 Dako® código MZ165)
- MMP1 (policlonal Neomarkers® código RB-9225P)
- MMP9 (policlonal Neomarkers® código RB-9234P)
- MMP14 (policlonal Neomarkers® código RB-9254P1)
- Bcl-2(Clone 124 Dako® código M0887)
- APAF-1(clone E38 marca Epitomics® código 1038-1)

- Caspase 8-(clone 11B6 marca NovoCastra® código NCL-CASP-8)
- Caspase 9-(clone 2C9B11 marca NovoCastra® código NCL-CASP-9).
- FAS/CD95, APO-1/DX2– Mouse anti-human. Clone: DX2. DAKO – cat M3554
- FAS-L – Mouse anti-human – clone 5D1 NOVOCASTRA – cat NCL-FAS-L.

O período de incubação em câmara úmida foi de 2 horas, à temperatura ambiente. Após a incubação as lâminas foram lavadas em tampão PBS com três trocas de 5 minutos cada. Após, foram incubadas com NovoLink Max Polymer (Novocastra®) segundo instruções do fabricante por 30 minutos a temperatura ambiente para o pós primário, seguidas por três lavagens de 5 minutos em PBS. As lâminas foram reveladas com solução de Diaminobenzidina (DAB, DAKO®) e contra coradas com hematoxilina de Harris (Merck®).

#### **3.4.2 Leitura das Lâminas de Imunoistoquímica**

Para leitura das lâminas foi utilizado o aparelho Scanscope e o software Aperio. Para os espécimes incluídos no TMA, avaliados dois “spots” de cada caso (a reação foi feita em 2 lâminas com intervalo de 50 cortes entre elas, para garantir que se avalie áreas distintas do tumor). A amostra foi considerada representativa quando continha neoplasia em pelo menos 25% do cilindro.

### 3.4.3 Interpretação das Reações Imunoistoquímicas

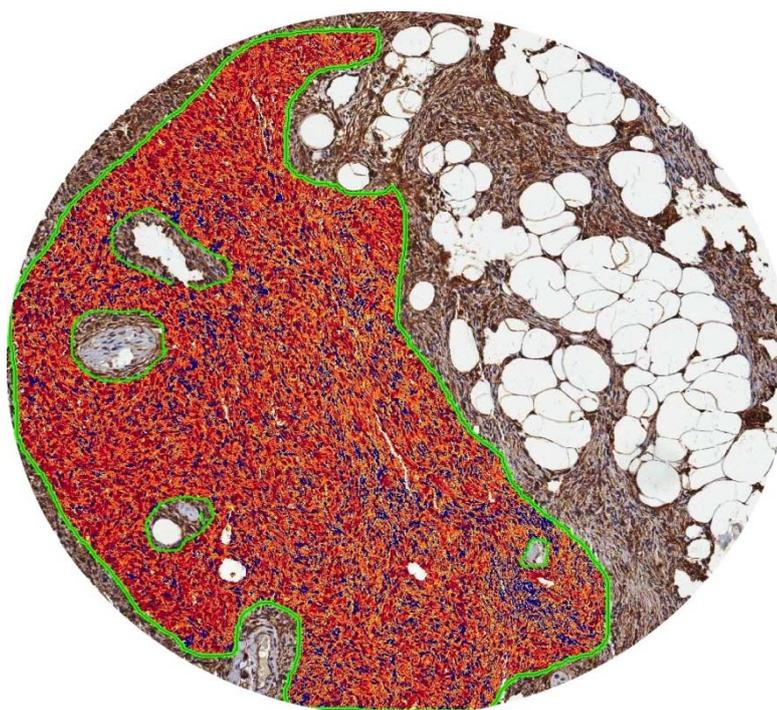
O APERIO SCANSCOPE XT realizou a análise quantitativa da expressão de todas imunoistoquímicas. Especificações do aparelho e principais passos na análise do TMA encontram-se nos anexos.

De maneira resumida, os componentes do APERIO SCANSCOPE XT consistem de um microscópio digital automatizado (escaneador de lamínas) e de um computador com janela para captura de imagens e um sistema de processamento das imagens. Cada lamina corada por imunoistoquímica é digitalizada e as imagens capturadas são revisadas pelo patologista na tela do computador. A área tumoral é marcada pelo patologista. O APERIO SCANSCOPE XT é capaz de detectar, contar e classificar células baseadas na cor, tamanho e formato. Detalhes sobre o “hardware” e “software” do APERIO SCANSCOPE XT estão disponíveis no web site da empresa ([www.aperio.com](http://www.aperio.com)).

Para análise da expressão utilizou-se a função computacional *Positive Pixel Count*. Desta forma é possível uma análise mais uniforme e mais objetiva das amostras. As lâminas de TMA foram escaneadas e todos os spots do TMA foram analisados para a delimitação da área tumoral. A análise da positividade é feita pelo software pela contagem de pixels, sendo este valor expresso em porcentagem.



**Figura 12** - Spot de TMA com IHM positiva para CD34



**Figura 13** - Análise da positividade pelo software Aperio. Áreas vermelhas são forte positivas, alaranjadas médio positivas, amarelo fracas positivas e azul negativas. Áreas brancas são automaticamente descartadas pelo software. Spot com 1mm de diâmetro.

#### **3.4.4 Estudo da Fusão de COL-1A1/ PDGF- $\beta$**

Foi realizada pela hibridização in situ fluorescente (FISH)

#### **3.4.5 Hibridização in situ fluorescente (FISH)**

A Hibridização in situ fluorescente foi realizada em “tissue microarray” contendo os casos de DFSP “spotados” em duplicata. Por não existir sondas para a pesquisa da mutação do DFSP em nosso país, a análise de hibridização in situ foi realizada na Clínica Mayo, Minnesota, USA. Sondas locus específicas para os cromossomos 17 e 22 envolvendo os genes COL1A1 e PDGF- $\beta$  foram aplicadas aos cortes de tecido obtidos a partir dos blocos de parafina. As hibridizações foram realizadas em ensaios com dois dias de duração. Os cortes histológicos de 5  $\mu$ m de espessura foram colocados em lâminas de vidro cobertas com material adesivo. Em seguida foram submetidos a desparafinização com xileno quente (70° C) e frio (temperatura ambiente) por 20 minutos cada, seguindo-se de 3 passagens adicionais em xileno a temperatura ambiente, 5 minutos cada. Após 3 passagens em álcool absoluto e lavagem com água corrente, as lâminas foram colocadas por 20 minutos em solução de 0,2N HCL a temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas em água corrente e aquecidas em solução 2xSSC a 75°C em banho-maria por 30 minutos. Os cortes foram então submetidos à digestão enzimática com proteinase K (0.25mg/ml diluída em 2x SSC -tampão salino de citrato de sódio) por 20 minutos a 45°C em banho-maria, lavados com solução 2 x SSC, desidratados com etanol em concentrações crescentes (70%, 85% e 96%, 2 minutos cada) e

deixados secando na temperatura ambiente por 45 minutos. Em seguida foi realizada a aplicação das sondas sobre os cortes de tecido, cobertos com lamínula e vedados com material selante. As lâminas foram colocadas no hibridizador (Hybridizer - DAKO®) e foi realizada a codenaturação da sonda e espécime por 10 minutos a 80°C, seguindo-se de hibridização a 37°C por 18 horas (ou segundo indicação do fabricante). No segundo dia, os cortes foram retirados do hibridizador e, após remoção do selante, colocados por 30 minutos em uma solução de 1,5M Urea/0,1 xSSC pré-aquecida a 45° C, lavados com solução 2x SSC a temperatura ambiente por 2 minutos, desidratados com passagens em etanol (70%, 85% e 96%, 2 minutos cada) e deixados secando por cerca de 1 hora em local escuro. A seguir foi feita a contracoloração com 20 µl de DAPI (meio de montagem contendo DAPI, Vysis®) e montagem com lamínula. As lâminas foram levadas para observação no microscópio trinocular com fluorescência de mercúrio (Olympus® BX41-FL-III), equipado com objetiva de imersão e com os filtros adequados. As imagens obtidas foram capturadas com uma câmera colorida digital refrigerada (5.1 megapixel) acoplada ao microscópio acima, usando o programa para análise de imagem Image Pro®Plus versão 6.0 (Olympus®).

Em cada caso, sinais fluorescentes foram contados em um mínimo de 100 núcleos, para cada conjunto de sondas, estabelecendo a localização entre os sinais de interesse.

### **3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A caracterização da população de estudo foi realizada por meio de estatística descritiva.

Para a análise dos fatores clínicos relacionados com a recorrência foi utilizado o teste exato de Fischer. Não foi possível utilizar Kaplan-Meier para avaliação da sobrevida livre de doença devido à pequena amostra e o pequeno número de recorrências.

Para avaliação da relação da intensidade dos marcadores com a recorrência foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

O nível de significância adotado em todos os testes estatísticos foi igual a 5%.

Os cálculos foram realizados com software SPSS®.

## 4 RESULTADOS

Dos 61 pacientes, 31 (50,8%) são do sexo masculino e 30 (49,2%) feminino, não havendo relação do gênero com chance de recidiva.

O seguimento mediano foi de 70,9 meses, sendo o mínimo 1,84 mês e o máximo 264,7 meses. O desvio padrão foi 49,6.

A média de idade foi 36,43 e a mediana 36, com um desvio padrão de 14,1. O paciente com menor idade apresentava 2 anos e o com maior idade era 73 anos.

Quanto a localização dos tumores, 32 (52,5%) apresentavam o tumor no tronco, 19 (31,1%) em membros e 10 (16,4%) em cabeça e pescoço.

Apesar do pequeno número de recidivas após o tratamento no Hospital A. C. Camargo, 17 pacientes (27,9%) já haviam apresentado pelo menos uma recorrência antes do tratamento no Hospital A. C. Camargo, 5 (8,2%) apresentaram duas recidivas, 4 (6,6%) 3 recidivas e 1 (1,6%) 4 recidivas. 34 (55,7%) chegaram ao hospital para o primeiro tratamento da doença.

Em relação às margens cirúrgicas, 32 pacientes (52,5%) foram tratados com margens cirúrgicas de 3cm ou mais, enquanto 26 (42,6%) foram tratados com margens inferiores à 3 cm. Categorizando as margens cirúrgicas, 16 (26,2%) tiveram margens menores que 2 cm, 10 (16,4%) margens entre 2 e 3cm, 32 (52,5%) com margens com 3cm ou mais.

**Tabela 2** - Características clínicas e epidemiológicas dos 61 pacientes com dermatofibrossarcoma

Variável	n	(%)
<b>Sexo</b>		
Masculino	31	49,2%
Feminino	30	50,8%
<b>Localização</b>		
Cabeça e pescoço	10	16,4%
Tronco	32	52,5%
Membros	19	31,1%
<b>Recorrência do tumor antes da admissão A C</b>		
<b>Camargo</b>		
Sim	27	44,3%
Não	34	55,7%
<b>Margem cirúrgica de pelo menos 3 cm</b>		
Sim	32	52,5%
Não	26	42,6%
<b>Margem cirúrgica categorizada</b>		
Até 1,9cm	16	26,2%
2 à 2,9 cm	10	16,4%
3 cm ou mais	32	52,1%
<b>Radioterapia</b>		
Sim	6	9,8%
Não	55	90,2%
<b>Translocação genômica</b>		
Sim	35	77,8%
Não	10	22,2%

Em relação ao tratamento adjuvante, apenas 9,8% (6) realizaram radioterapia e 90,2% (55) receberam tratamento cirúrgico isolado.

Quanto a translocação genômica presente na maioria dos casos de dermatofibrossarcoma, foi possível análise por hibridização in situ em apenas 73,8% dos blocos de parafina, sendo que nos que foram pesquisados, a positividade da translocação ocorreu em 77,8%.

## **4.1 FATORES RELACIONADOS COM A RECORRÊNCIA APÓS TRATAMENTO NO A.C. CAMARGO**

Para a avaliação dos casos das recorrências, foram consideradas apenas as recorrências que ocorreram após o tratamento no HACC, ou seja, nesta análise haviam pacientes que nunca apresentaram recidiva e pacientes que haviam apresentado recidiva prévia ao tratamento no HACC. Ocorreram apenas seis recorrências após o tratamento no HACC.

### **4.1.1 Gênero**

O Gênero não interferiu no risco de recorrência. 2 (6,7%) dos pacientes femininos recorreram contra (12,9%) dos masculinos.  $P=0,671$

### **4.1.2 Localização do tumor**

A localização do tumor também não interferiu na recorrência. As recidivas em cabeça e pescoço, tronco e membros foram 1 de 10 pacientes (10%), 3 de 32 (9,4%) e 2 de 19 (10,5 %) respectivamente.  $P=0,326$ .

**Tabela 3** – Localização do tumor e recorrência tumoral

	Recorrência		p
	Não	Sim	
<b>Localização</b>			
Cabeça e pescoço	9 (90,0%)	1 (10,0%)	0,326
Tronco	29 (90,6%)	3 (9,4%)	
Membros	17 (89,5%)	2 (10,5%)	

Ocorreram apenas 3 (4,91%) óbitos entre estes pacientes, sendo apenas 1 (1,6%) relacionada com o dermatofibrossarcoma.

#### 4.2 RECORRÊNCIA DO TUMOR ANTES DA ADMISSÃO NO A. C. CAMARGO

Entre os pacientes que não tiveram recidiva antes ao AC Camargo apenas 2 (5,7%) apresentaram recidiva após o tratamento, enquanto os que já haviam apresentado recorrência antes do A. C. Camargo, 4 (15,4%) recidivaram, porém não houve significância estatística. P=0,387

**Tabela 4** – Relação da recorrência tumoral e status antes da admissão ao HACC

História de recorrência tumoral antes da admissão HACC	Recorrência após tratamento no A C Camargo		p
	Não	Sim	
Não	33 (94,3%)	2 (5,7%)	0,387
Sim	22 (84,6%)	4 (15,4%)	

#### 4.2.1 Margens cirúrgicas 3 cm ou mais

Nesta amostra, nenhum paciente com 3 cm ou mais de margens apresentou recorrência, ao contrário, os pacientes tratados com menos de 3 cm de margens apresentaram 5 (19,2%) de recorrência.  $p = 0,014$

**Tabela 5** – Margens de pelo menos 3 cm e recorrência tumoral

Margem cirúrgica de pelo menos 3 cm	Recorrência do tumor		p
	Não	Sim	
Não	21 (80,8%)	5 (19,2%)	0,014
Sim	32 (100,0%)	0 (0%)	

#### 4.2.2 Margens 2 cm

Utilizando margens de 2 cm como corte, obtivemos 4 (25,0%) recorrências em pacientes com margens menores que 2cm contra 1 (2,4%) nos pacientes com margens maiores que 2cm.  $P=0,018$

**Tabela 6** – Margens cirúrgicas de pelo menos 2 cm e recorrência tumoral

Margens cirúrgicas de pelo menos 2 cm	Recorrência do tumor		p
	Não	Sim	
Não	12 (75,0%)	4 (25,0%)	0,018
Sim	41 (91,4%)	1 (2,4%)	

#### 4.2.3 Margens cirúrgicas categorizadas

Categorizando as margens em até 1,9cm, 2 a 3cm ou maior que 3cm, houve diferença em relação ao valor da margem.  $P = 0,01$

**Tabela 7 – Margens cirúrgicas e recorrência tumoral**

Margem cirúrgica	Recorrência do tumor		p
	Não	Sim	
< 2 cm	12 (75,0%)	4 (25,0%)	0,01
≥ 2 e < 3 cm	9 (90,0%)	1 (10,0%)	
3 cm ou mais	32 (100,0%)	0 (0,0%)	

- **FISH**

A positividade do FISH não apresentou significância estatística em relação a recorrência, apesar da discrepância da evolução entre os dois grupos, 3 (30,0%) recidivas nos pacientes com FISH negativo contra 2 (5,7%) em pacientes com FISH positivo. P=0,065. Isto ocorreu provavelmente devido ao pequeno número de recidivas

**Tabela 8 - Relação do status do FISH e recorrência tumoral**

FISH	Recorrência do tumor		p
	Não	Sim	
<b>Negativo</b>	7 (70,0%)	3 (30,0%)	0,065
<b>Positivo</b>	33 (94,3%)	2 (5,7%)	

**Tabela 9** – Positividade dos marcadores: média, mediana, variação e desvio padrão

<b>Marcador</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>MMP1</b>	0,61	0,63	0,13	0,99	0,24
<b>MMP9</b>	0,70	0,75	0,07	0,98	0,22
<b>MMP14</b>	0,35	0,26	0,01	0,87	0,25
<b>Bcl-2</b>	0,21	0,17	0,01	0,67	0,17
<b>FASL</b>	0,47	0,51	0,01	0,97	0,29
<b>FAS</b>	0,75	0,83	0,11	0,98	0,21
<b>CASPASE 8</b>	0,47	0,49	0,01	0,99	0,32
<b>CASPASE 9</b>	0,37	0,34	0,01	0,94	0,25
<b>APAF-1</b>	0,077	0,049	0,00	0,75	0,11
<b>BAX</b>	0,39	0,33	0,00	0,97	0,29
<b>MIB1</b>	0,43	0,47	0,03	0,89	0,24
<b>CD34</b>	0,68	0,79	0,05	0,99	0,27

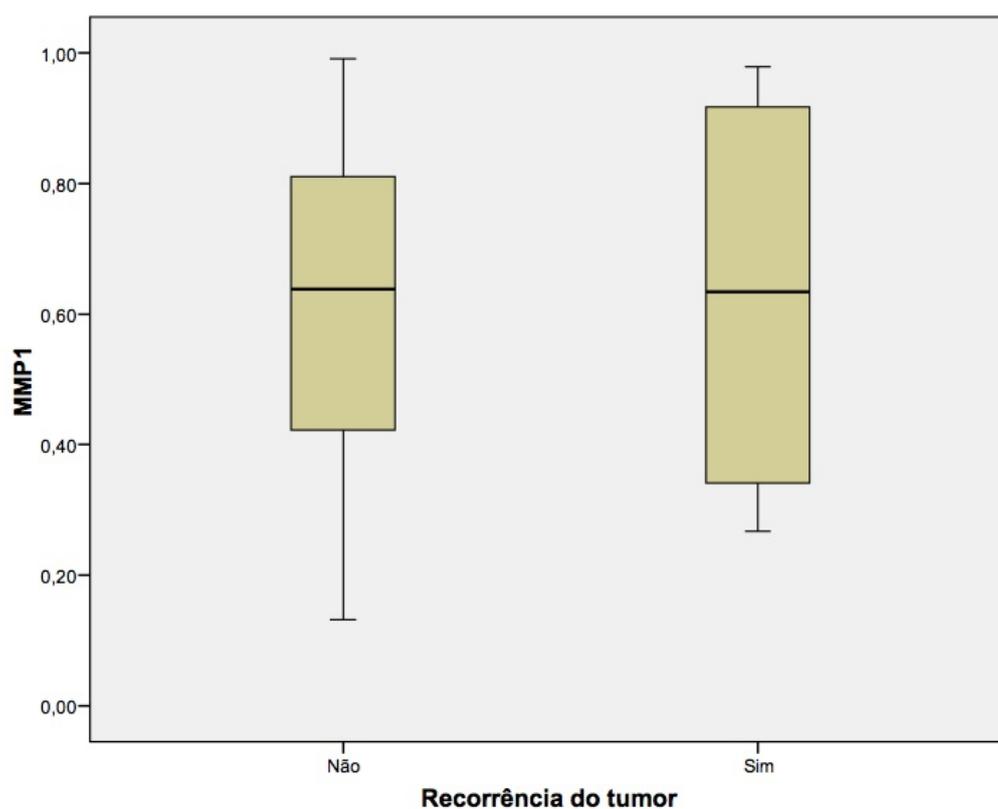
**Tabela 10** – O teste de Mann-Whitney não mostrou significância estatística entre as amostras de pacientes com recidiva e sem recidiva. O valor de p refere-se ao teste de Mann-Whitney, mostrando indiretamente a diferença entre os dois grupos

<b>Marcador</b>	<b>Mediana de positividade do marcador de acordo com a recidiva</b>		
	<b>Com recidiva</b>	<b>Sem recidiva</b>	<b>p</b>
<b>MMP1</b>	0,6343	0,6385	0,874
<b>MMP9</b>	0,8195	0,7487	0,598
<b>MMP14</b>	0,2327	0,2623	0,891
<b>BCL-2</b>	0,3356	0,1583	0,306
<b>FAS</b>	0,6639	0,8384	0,331
<b>FASL</b>	0,6777	0,4994	0,265
<b>CASPASE 8</b>	0,6457	0,4284	0,410
<b>CASPASE 9</b>	0,4063	0,3193	0,484
<b>APAF-1</b>	0,0400	0,0490	0,5
<b>BAX</b>	0,3921	0,3232	0,716
<b>MIB1</b>	0,4823	0,4796	0,874
<b>CD34</b>	0,5423	0,7944	0,09

### 4.3 RECORRÊNCIA EM RELAÇÃO AO MARCADORES

#### 4.3.1 Marcadores de invasividade

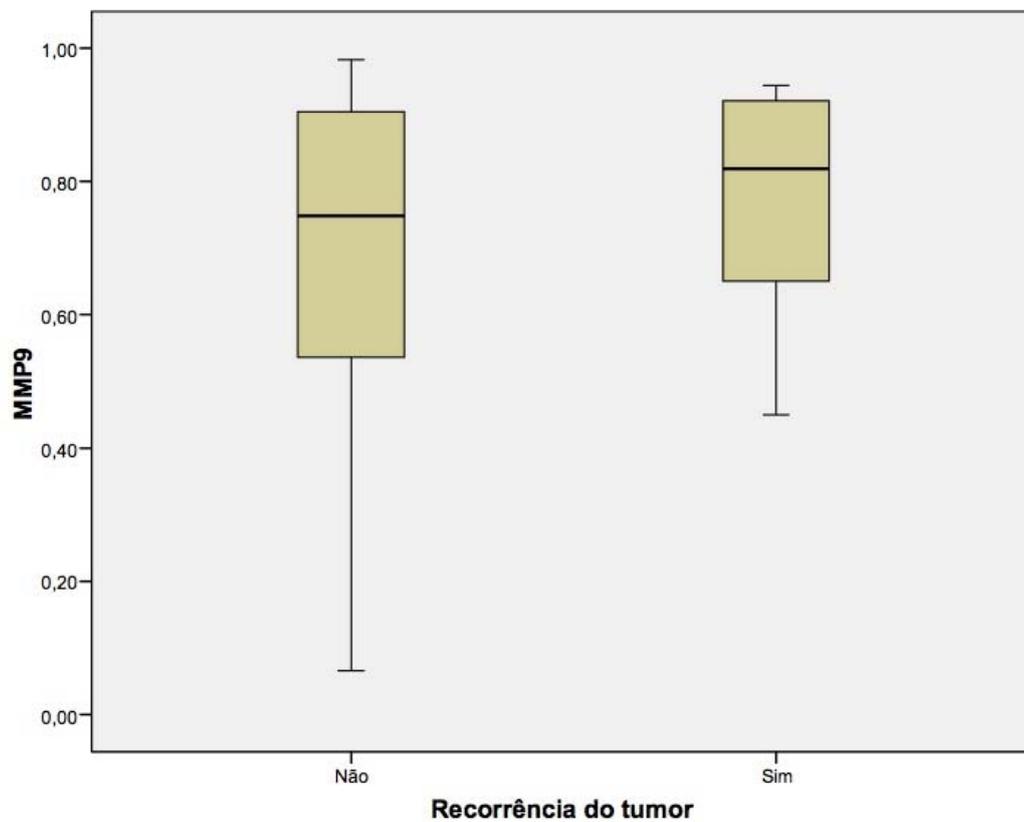
- **MMP1**



**Figura 14** – Boxplot MMP1 e recorrência.  $p=0,874$

Não houve relação da intensidade da positividade do marcador MMP1 com a recorrência. O teste de Mann-Whitney não mostrou significância estatística.  $p=0,874$

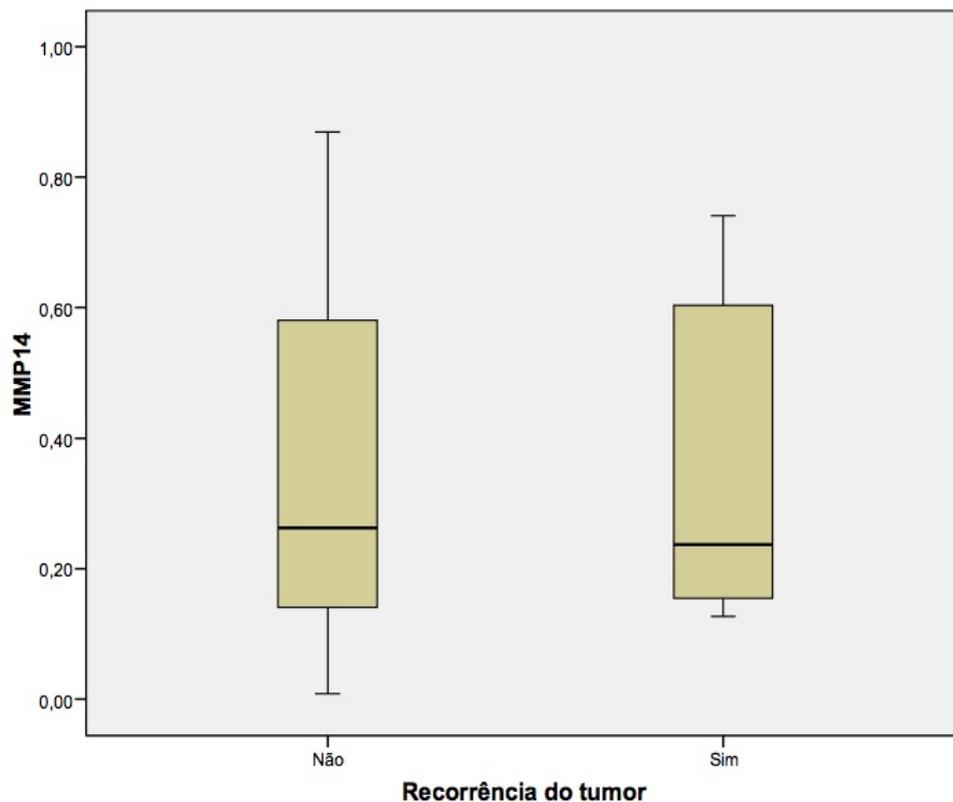
- **MMP9**



**Figura 15** – Boxplot MMP9 e recorrência.  $p=0,598$

Não houve relação da intensidade da positividade do marcador MMP9 com a recorrência. O teste de Mann-Whitney não mostrou significância estatística.  $p=0,598$

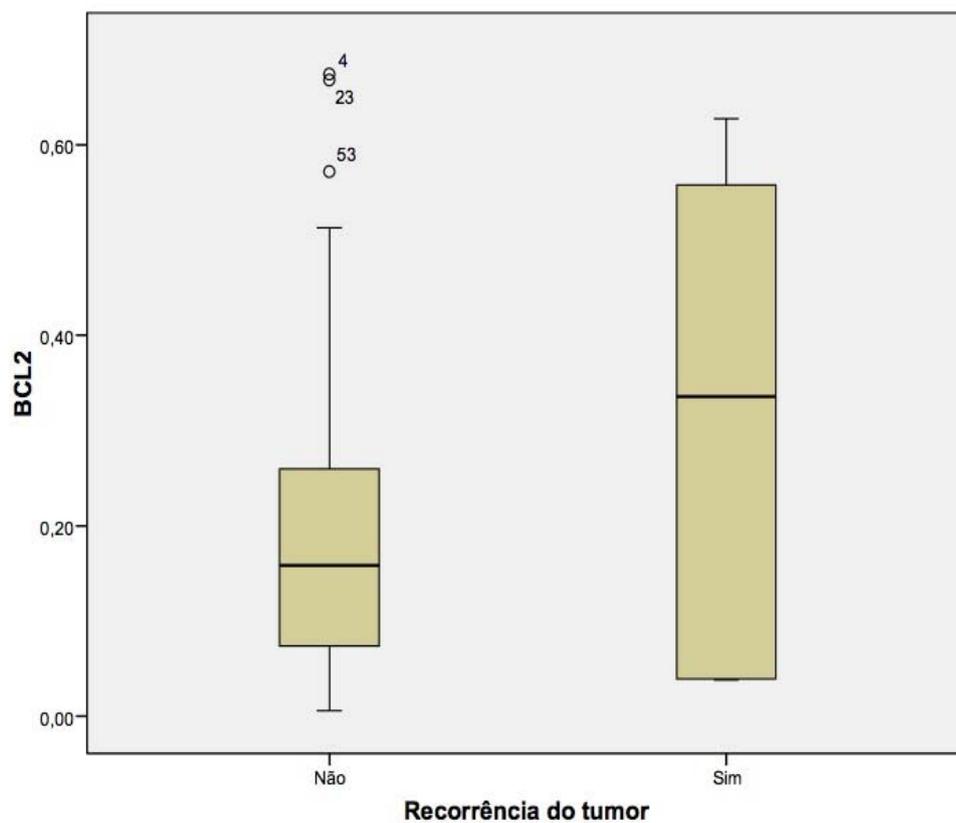
- **MMP14**



**Figura 16** - Boxplot MMP14 e recorrência.  $p=0,891$

Não houve relação da intensidade da positividade do marcador MMP14 com a recorrência. O teste de Mann-Whitney não mostrou significância estatística.  $p=0,891$

- **BCL-2**

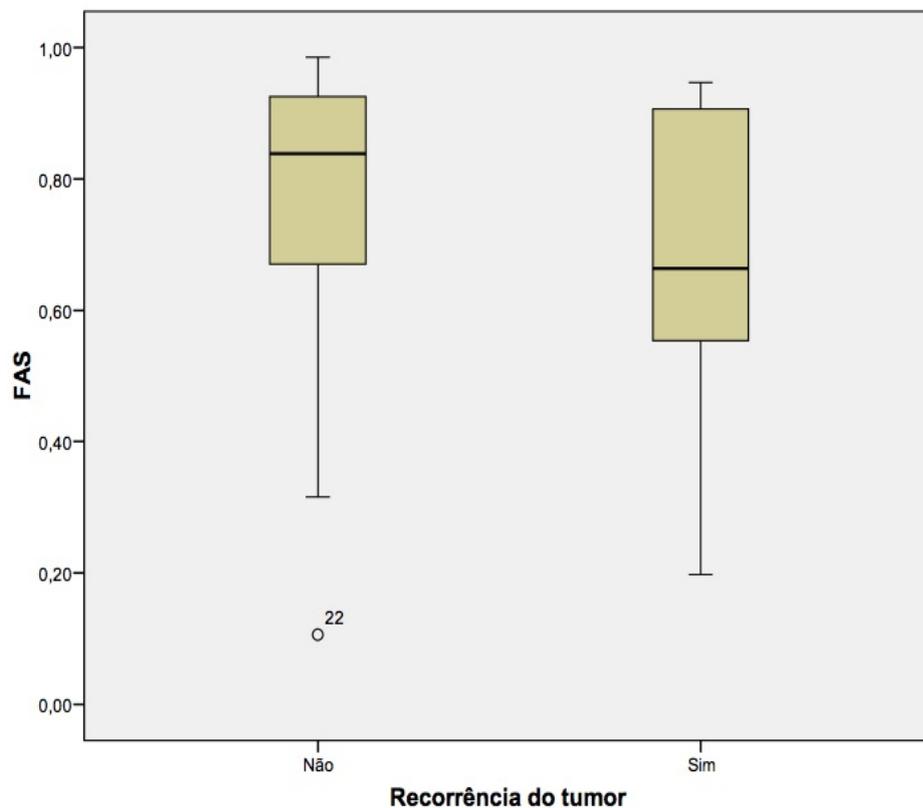


p=306

**Figura 17** - Boxplot Bcl-2 e recorrência. p=0,306

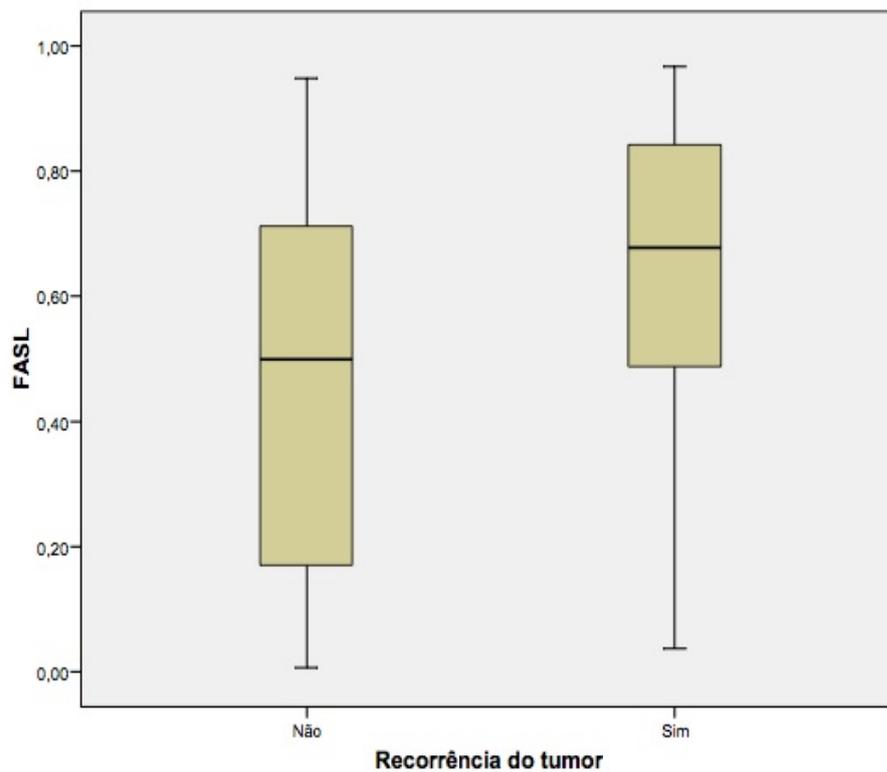
Não houve relação da intensidade da positividade do marcador BCL-2 com a recorrência. O teste de Mann-Whitney não mostrou significância estatística. p=0,306

- **FAS**



**Figura 18** - Boxplot FAS e recorrência.  $p=0,331$

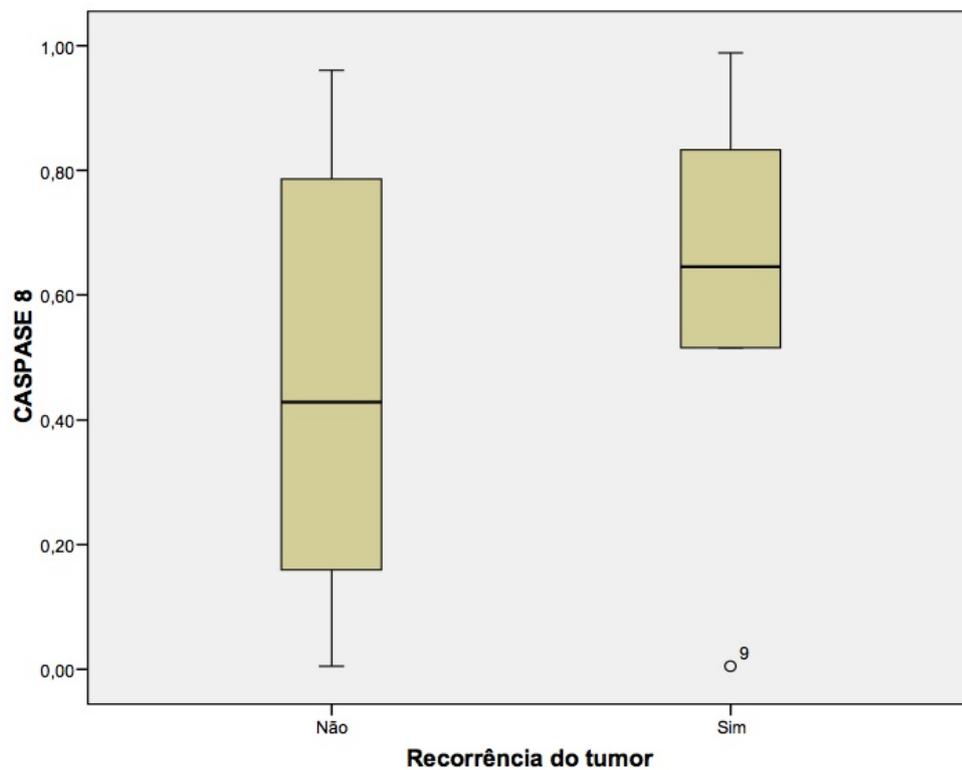
Não houve relação da intensidade da positividade do marcador FAS com a recorrência. O teste de Mann-Whitney não mostrou significância estatística.  $p=0,331$

**FASL**

**Figura 19** - Boxplot FASL e recorrência.  $p=0,265$

Não houve relação da intensidade da positividade do marcador FASL com a recorrência. O teste de Mann-Whitney não mostrou significância estatística.  $p=0,265$

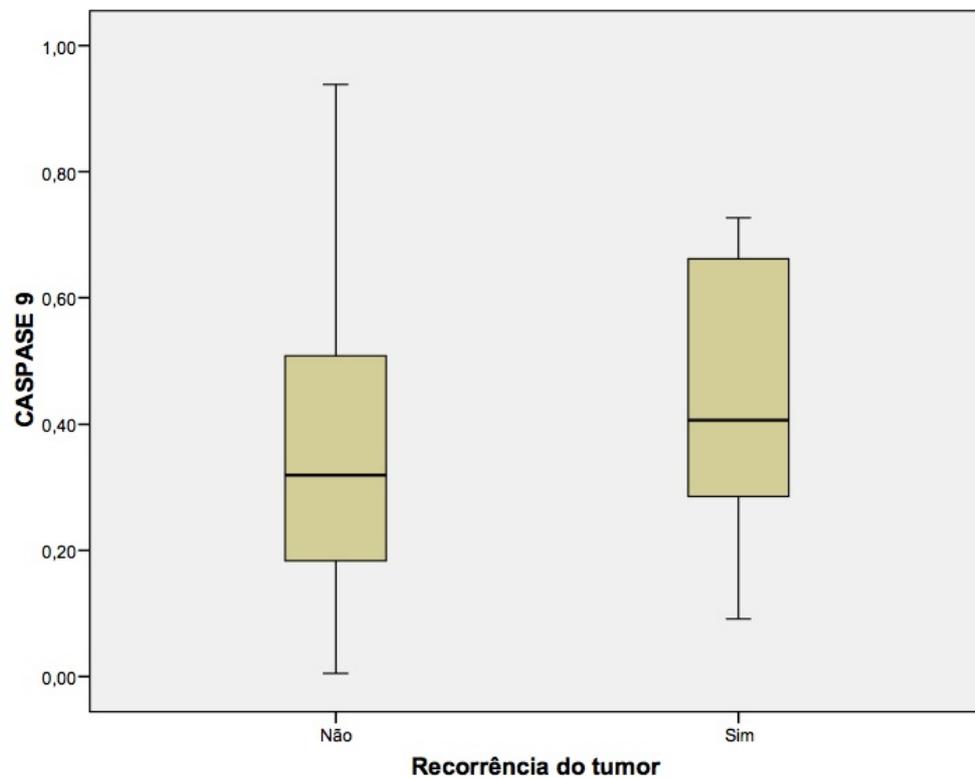
- **CASPASE 8**



**Figura 20** - Boxplot Caspase 8 e recorrência.  $p=0,410$

Não houve relação da intensidade da positividade do marcador CASPASE 8 com a recorrência. O teste de Mann-Whitney não mostrou significância estatística.  $p=0,410$

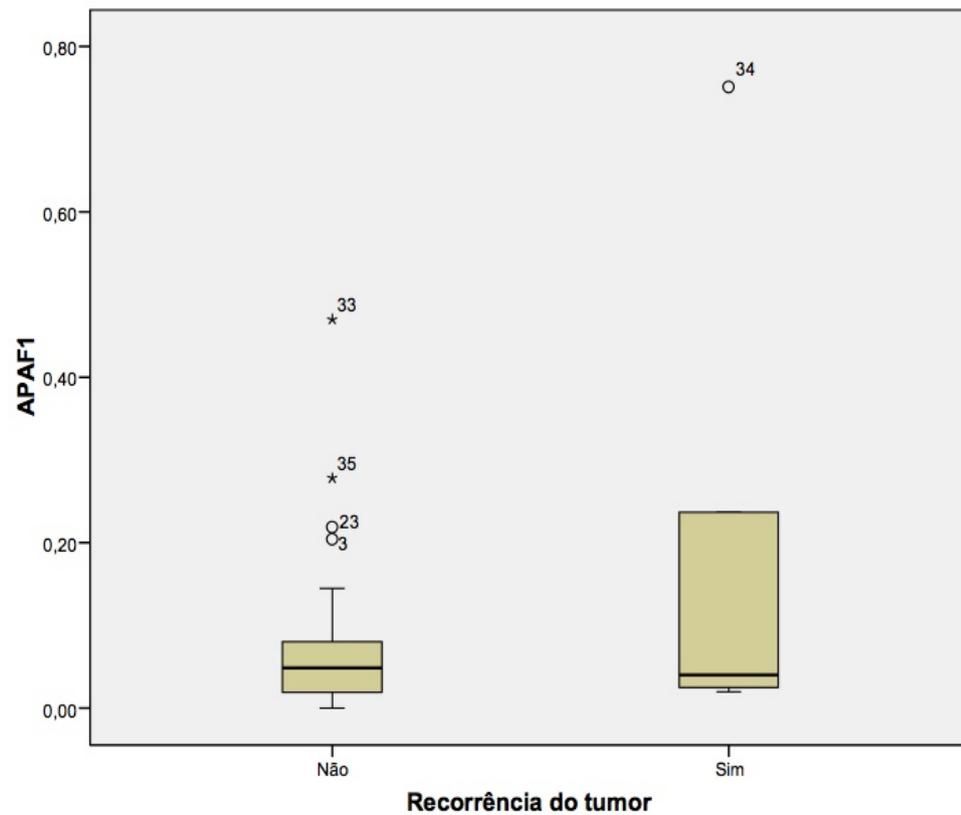
- **CASPASE 9**



**Figura 21** - Boxplot Caspase 9 e recorrência.  $p=0,484$

Não houve relação da intensidade da positividade do marcador CASPASE 9 com a recorrência. O teste de Mann-Whitney não mostrou significância estatística.  $p=0,484$

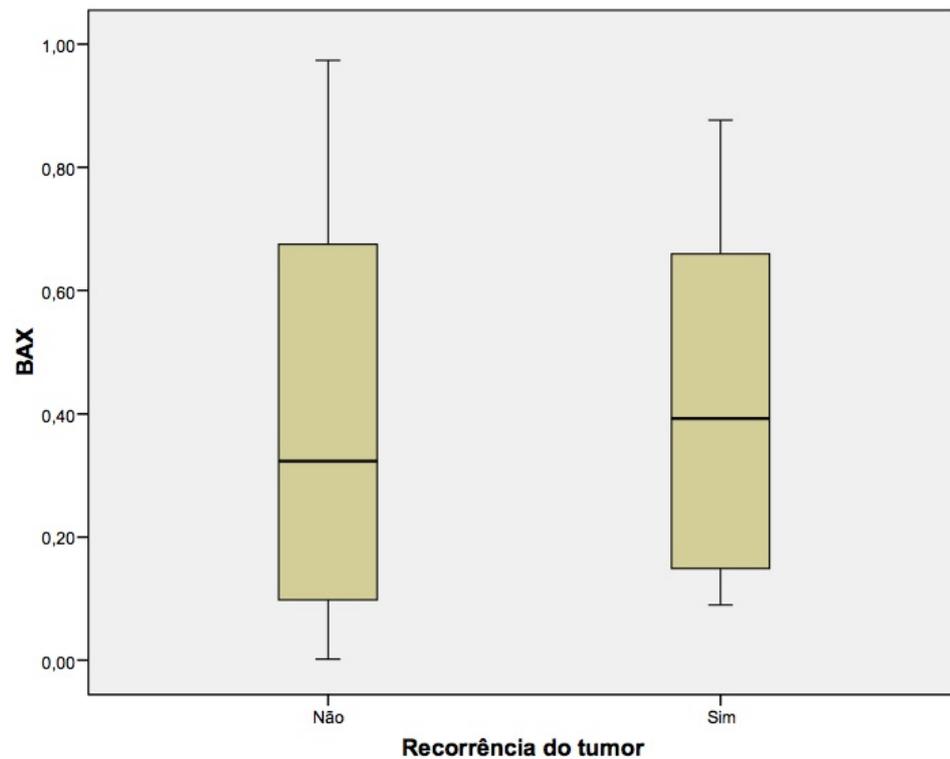
- **APAF-1**



**Figura 22** - Boxplot Apaf1 e recorrência.  $p=0,5$

Não houve relação da intensidade da positividade do marcador APAF 1 com a recorrência. O teste de Mann-Whitney não mostrou significância estatística.  $p=0,5$

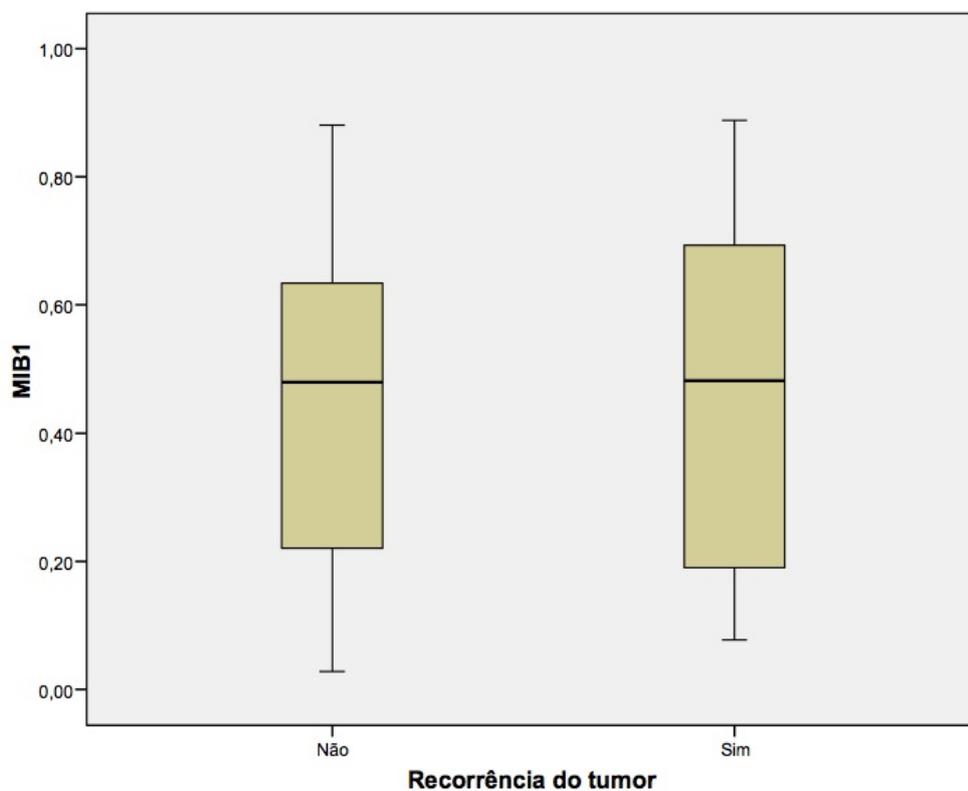
- **BAX**



**Figura 23** - Boxplot BAX e recorrência.  $p=0,716$

Não houve relação da intensidade da positividade do marcador BAX com a recorrência. O teste de Mann-Whitney não mostrou significância estatística.  $p=0,716$

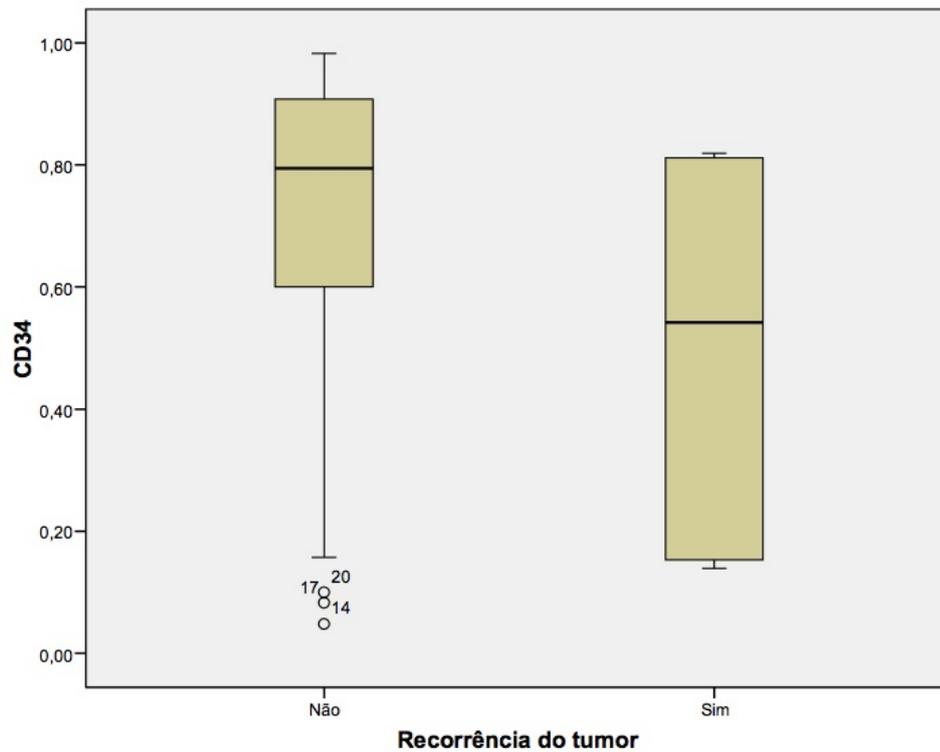
- **MIB1**



**Figura 24** - Boxplot MMP1 e recorrência.  $p=0,87$

Não houve relação da intensidade da positividade do marcador MIB 1 com a recorrência. O teste de Mann-Whitney não mostrou significância estatística.  $p=0,874$

- **CD34**



**Figura 25** - Boxplot MMP1 e recorrência.  $p=0,09$

Não houve relação da intensidade da positividade do marcador CD34 com a recorrência. O teste de Mann-Whitney não mostrou significância estatística.  $p=0,09$

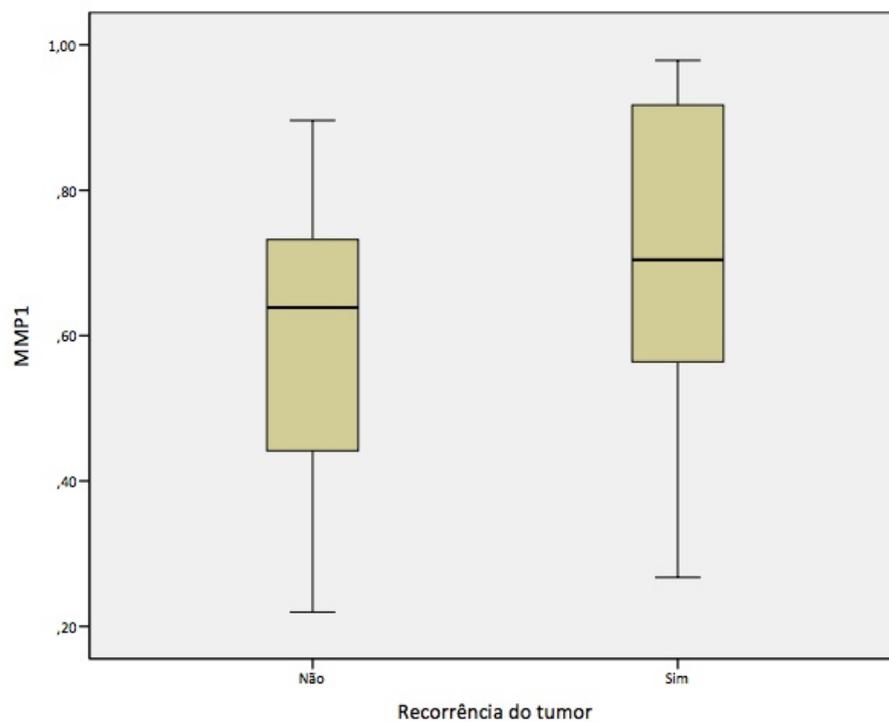
#### 4.4 RESULTADOS CONSIDERANDO PACIENTES TRATADOS COM MARGENS DE SEGURANÇA MENORES QUE 3 CM

**Tabela 11** - O teste de Mann-Whitney mostrou significância estatística apenas em relação ao marcador FASL comparando as amostras de pacientes com recidiva e sem recidiva. O valor de p refere-se ao teste de Mann-Whitney, mostrando indiretamente a relação entre os dois grupos.

Marcador	Mediana de positividade do marcador de acordo com a recidiva		
	Com recidiva	Sem recidiva	p
<b>MMP1</b>	0,7045	0,6385	0,406
<b>MMP9</b>	0,8825	0,7487	0,40
<b>MMP14</b>	0,3093	0,2640	0,691
<b>BCL-2</b>	0,3489	0,1872	0,088
<b>FAS</b>	0,6896	0,7479	0,972
<b>FASL</b>	0,7906	0,4561	0,048
<b>CASPASE 8</b>	0,6898	0,2775	0,063
<b>CASPASE 9</b>	0,4075	0,3669	0,446
<b>APAF-1</b>	0,0300	0,0600	0,836
<b>BAX</b>	0,4554	0,1092	0,289
<b>MIB1</b>	0,4948	0,3611	0,235
<b>CD34</b>	0,7803	0,7702	0,403

#### 4.4.1 Marcadores de invasividade

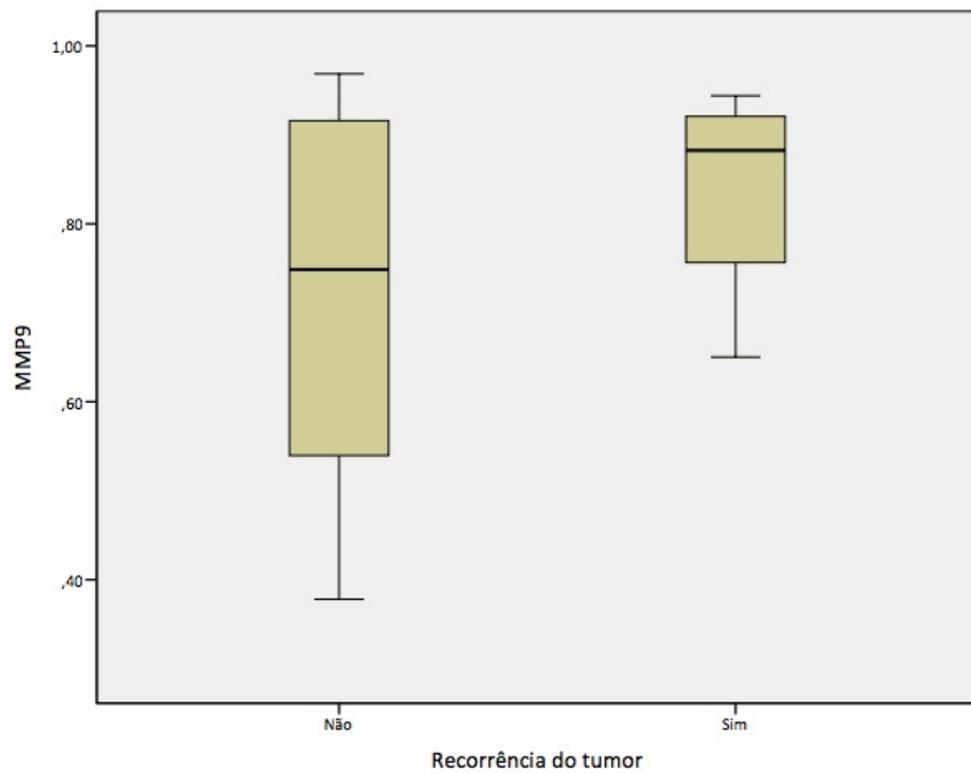
- **MMP1**



**Figura 26** – Boxplot MMP1 e recorrência.  $p= 0,406$

A metaloproteinase 1 não se relacionou com a taxa de recidiva do tumor nos pacientes tratados com margens de segurança menores que 3cm.  $p=0,406$

- **MMP9**

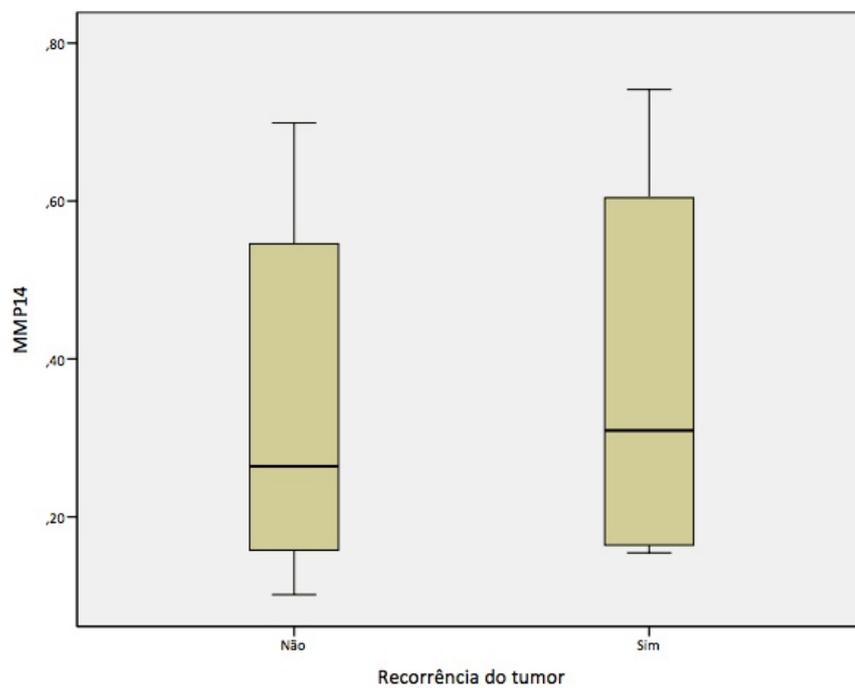


p=0,40

**Figura 27** - Boxplot MMP9 e recorrência. p= 0,40

A metaloproteinase 9 não se relacionou com a taxa de recidiva do tumor nos pacientes tratados com margens de segurança menores que 3cm. p=0,40

- **MMP14**



p=0,691

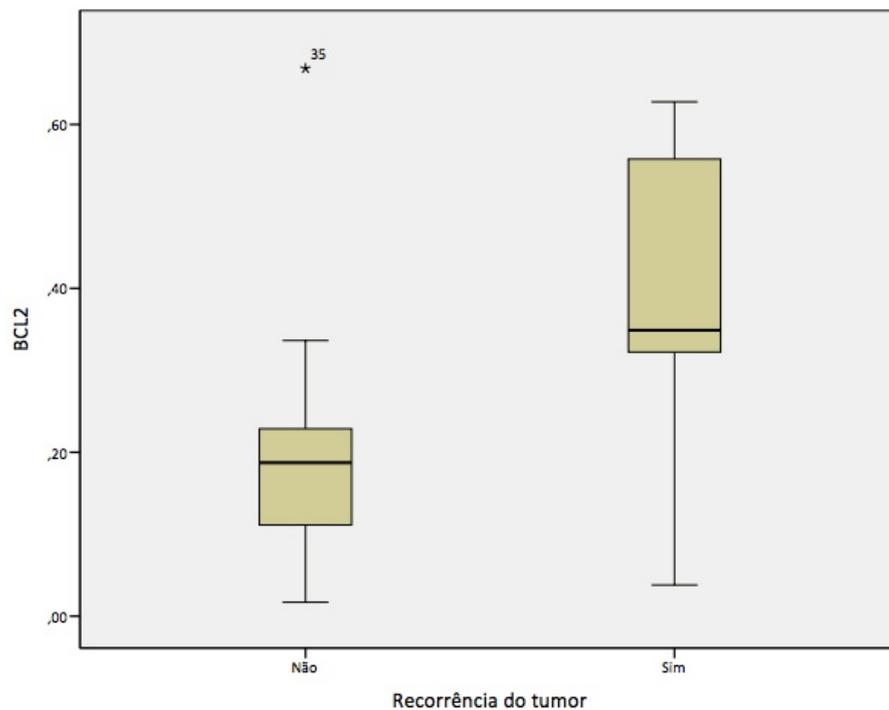
**Figura 28** - Boxplot MMP14 e recorrência. p= 0,691

A metaloproteinase 14 não se relacionou com a taxa de recidiva do tumor nos pacientes tratados com margens de segurança menores que 3cm.

p=0,691

#### 4.4.2 Marcadores de apoptose

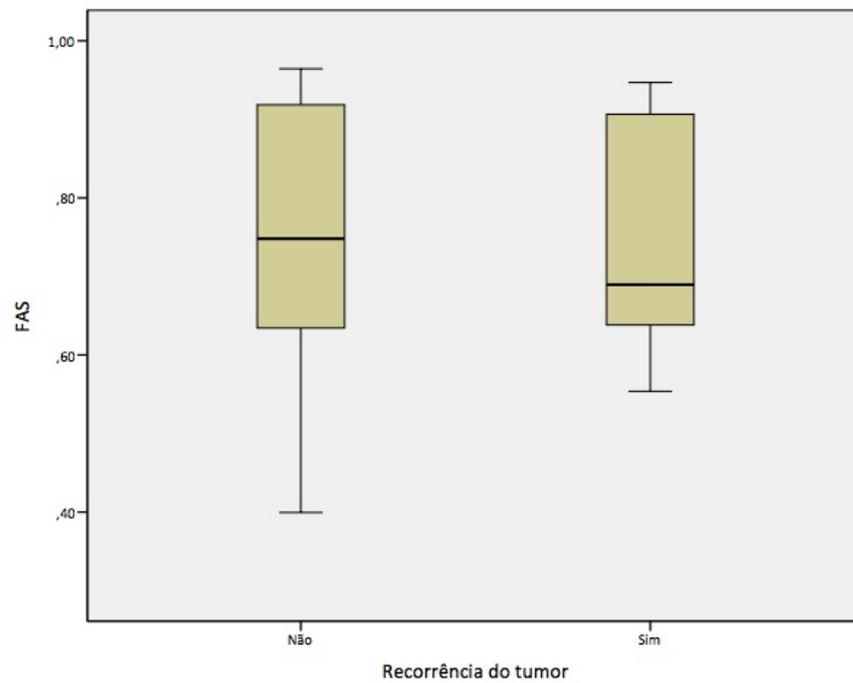
- **BCL-2**



**Figura 29** - Boxplot Bcl-2 e recorrência.  $p= 0,088$

A expressão marcador Bcl-2 não se relacionou com a taxa de recidiva do tumor nos pacientes tratados com margens de segurança menores que 3cm.  $P=0,088$

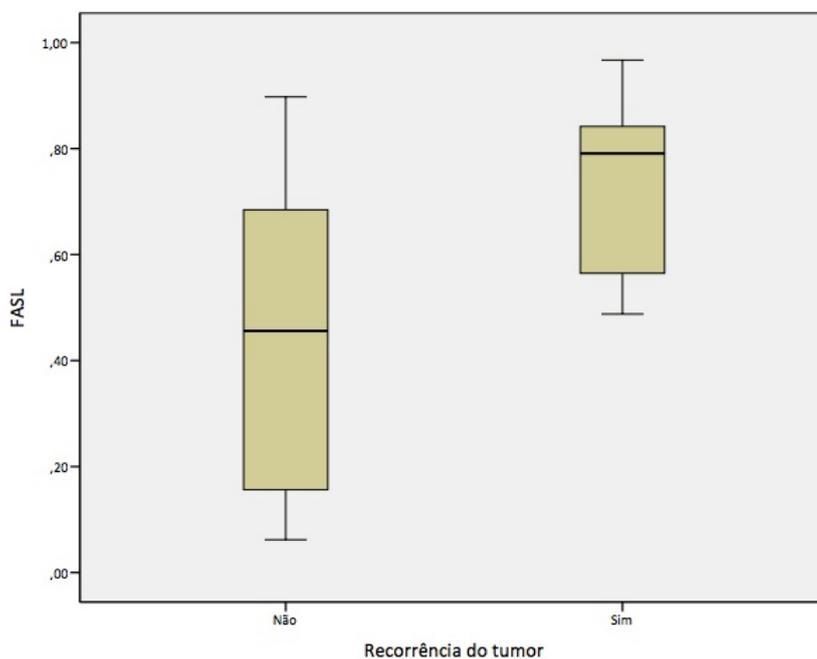
- **FAS**



**Figura 30** - Boxplot FAS e recorrência.  $p= 0,972$

A expressão do marcador FAS não se relacionou com a taxa de recidiva do tumor nos pacientes tratados com margens de segurança menores que 3cm.  $p=0,972$

- **FASL**

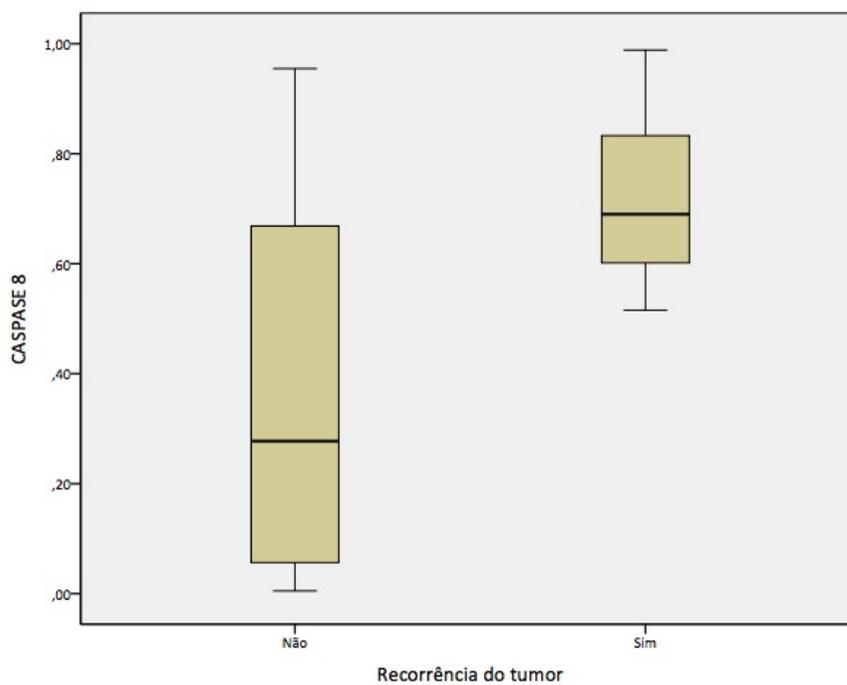


p=0,048

**Figura 31** - Boxplot FASL e recorrência. p= 0,048

Houve relação com a expressão da proteína FASL com a recidiva tumoral nos pacientes tratados com margens de segurança menores que 3cm. p=0,048

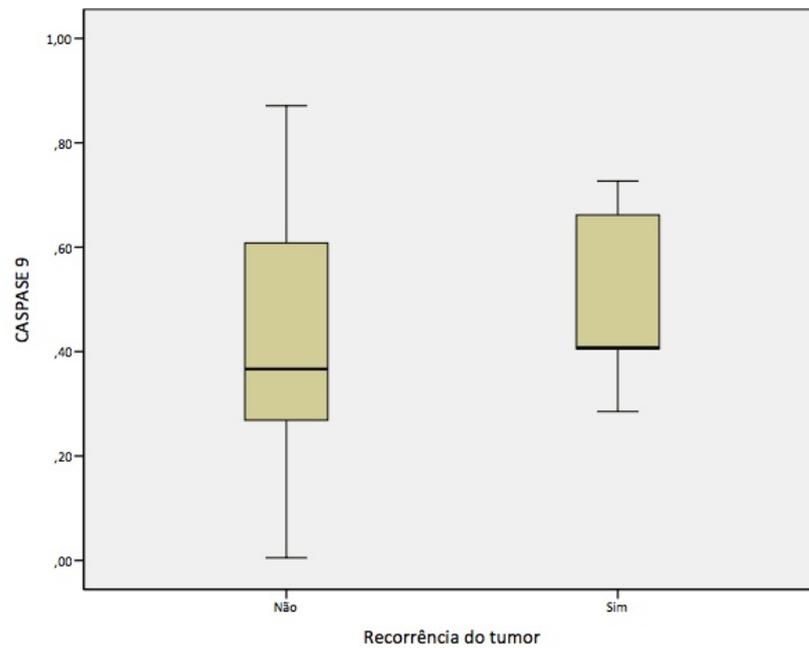
- **CASPASE 8**



**Figura 32** - Boxplot Bcl-2 e recorrência.  $p= 0,063$

A expressão do marcador caspase 8 não se relacionou com a taxa de recidiva do tumor nos pacientes tratados com margens de segurança menores que 3cm.  $p=0,063$

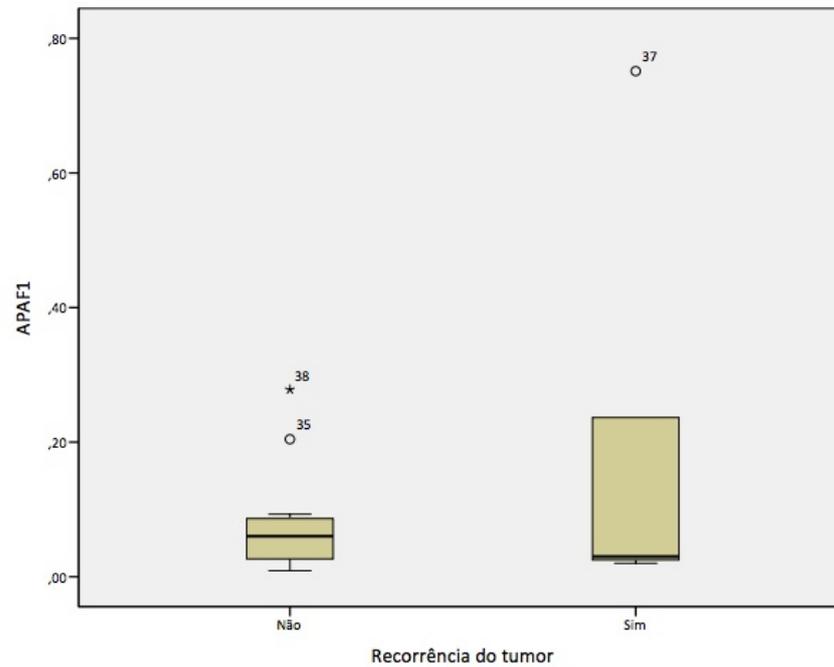
- **CASPASE 9**



**Figura 33** - Boxplot Caspase 9 e recorrência.  $p= 0,446$

A expressão do marcador caspase 9 não se relacionou com a taxa de recidiva do tumor nos pacientes tratados com margens de segurança menores que 3cm.  $p=0,446$

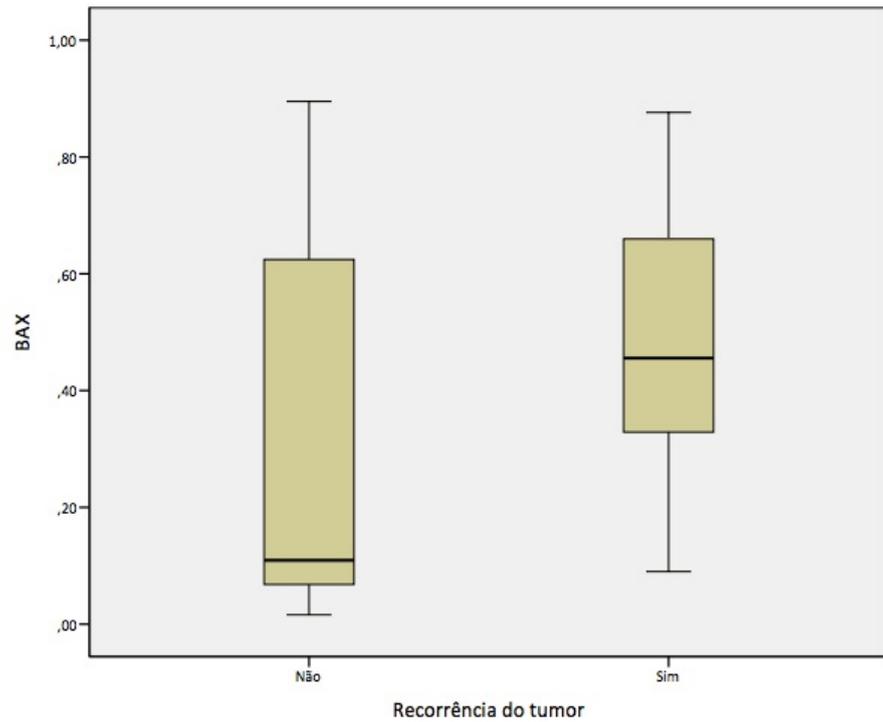
- **APAF-1**



**Figura 34** - Boxplot APAF-1 e recorrência.  $p= 0,836$

A expressão do marcador APAF-1 não se relacionou com a taxa de recidiva do tumor nos pacientes tratados com margens de segurança menores que 3cm.  $p=0,836$

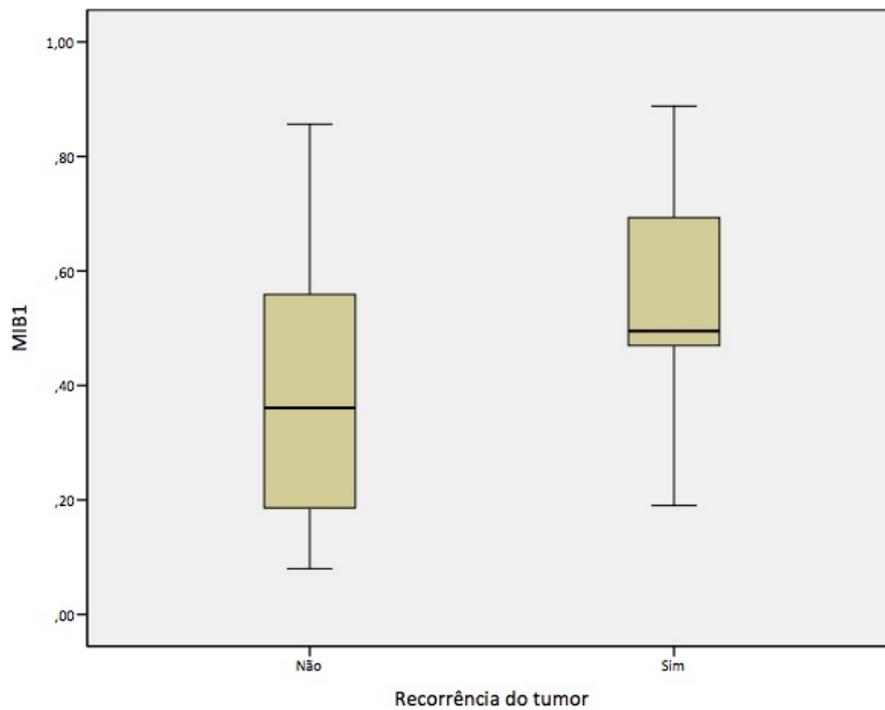
- **BAX**



**Figura 35** - Boxplot BAX e recorrência.  $p= 0,289$

A expressão do marcador BAX não se relacionou com a taxa de recidiva do tumor nos pacientes tratados com margens de segurança menores que 3cm.  $p=0,289$

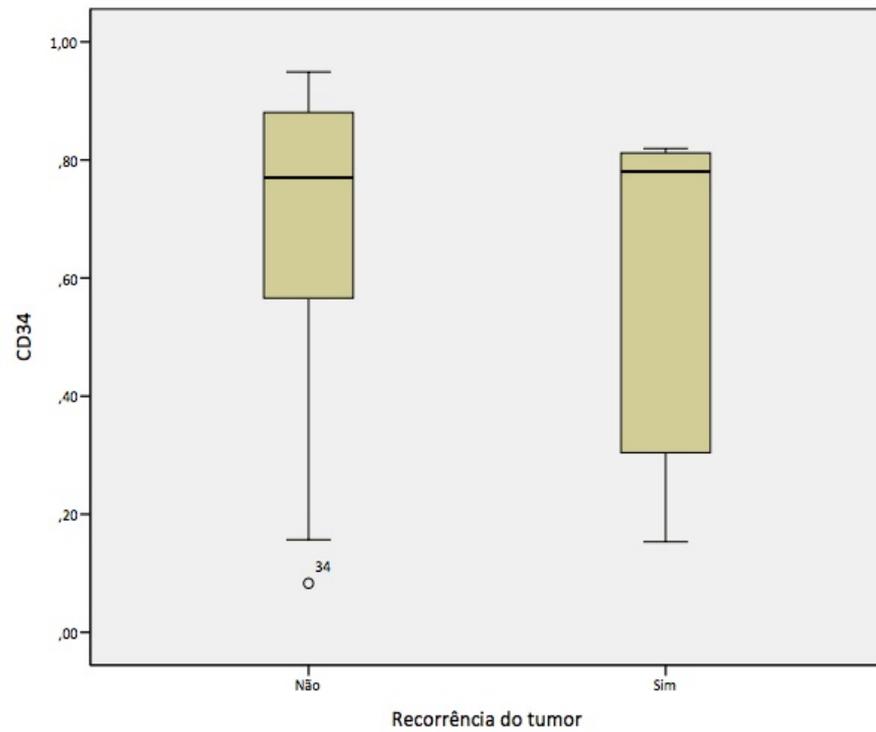
- **MIB1**



**Figura 36** - Boxplot MIB1 e recorrência.  $p= 0,235$

O marcador de proliferação celular não se relacionou com a taxa de recidiva do tumor nos pacientes tratados com margens de segurança menores que 3cm.  $p=0,235$

- **CD34**



**Figura 37** - Boxplot CD34 e recorrência.  $p= 0,403$

A expressão do marcador CD34 não se relacionou com a taxa de recidiva do tumor nos pacientes tratados com margens menores que 3cm.

$p=0,403$

- **FISH**

A presença da translocação não se correlacionou com a recorrência tumoral em pacientes tratados com margens menores que 3 cm.

**Tabela 12** – Status do FISH e recorrência tumoral em pacientes tratados com margens menores que 3 cm.

FISH	Recorrência do tumor		p
	Não	Sim	
<b>Negativo</b>	4 (66,7%)	2 (33,3%)	0,549
<b>Positivo</b>	12 (85,7%)	2 (14,3%)	

## 5 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo correlacionar o prognóstico dos pacientes com diversos marcadores de apoptose, invasão e proliferação celular, assim como com a presença da translocação característica do DFSP. A amostra de 61 casos apesar de pequena, é uma amostra significativa por se tratar de DFSP, um tumor com incidência tão pequena, o que resulta em estudos com pequena amostra de pacientes. Na literatura existem estudos com número maior de pacientes, porém não com análise de marcadores de apoptose, invasão e proliferação celular e realizando correlação com o prognóstico (LADSTEIN et al. 2010).

Alguns fatores que seriam de grande interesse não puderam ser avaliados, dentre eles, a invasão tumoral e o tamanho da neoplasia. Isso ocorreu pois a maior parte dos pacientes realizaram biópsias fora do A. C. Camargo. Apesar dos blocos terem sido trazidos ao Laboratório de Patologia para serem revisados, não foi possível avaliar o tamanho real da neoplasia que encontrava-se apenas no laudo anátomo patológico externo, assim como avaliar a invasão tumoral. Assim, estes fatores que são de grande interesse não puderam ser avaliados, ficando fora desta análise.

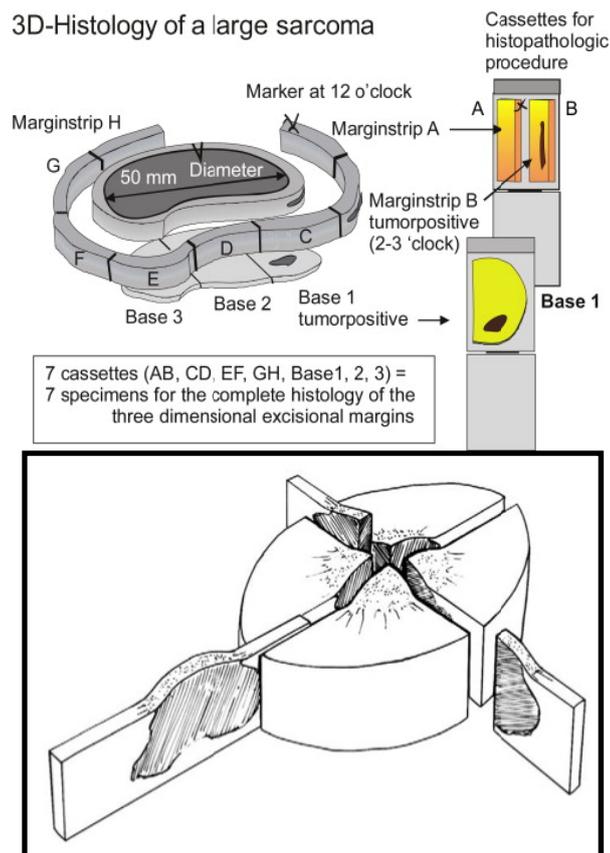
Um fator limitante neste trabalho foi o fato de haver apenas 6 recidivas em 61 pacientes (9,83%). Devido à estes pequenos números a análise estatística fica limitada, pois com mais casos provavelmente teríamos mais chances de obter significância estatística nas análises.

## 5.1 GÊNERO

O gênero, diferentemente de outros tumores cutâneos como o melanoma maligno em que pacientes do sexo feminino tendem a ter melhor prognóstico, no DFSP não houve diferença estatística em relação a recidivas.

## 5.2 MARGENS CIRÚRGICAS

Atualmente, a maioria dos casos de DFSP tratados no HACC, têm as margens avaliadas integralmente conforme método descrito por HÄFNER et al. (2008). A maior parte dos casos deste estudo tiveram as margens cirúrgicas avaliadas pelo método convencional com cortes transversais. Isto explica o total de 9,83% de recidiva, que é maior quando comparada às técnicas em que as margens cirúrgicas são avaliadas integralmente, porém ainda é baixa quando comparada com as séries com análise convencional das margens cirúrgicas, além do mais, 42,6% dos pacientes que realizaram tratamento no HACC já haviam tido pelo menos uma recidiva, ou seja, são pacientes com maior chance de falha terapêutica e com tumores mais difíceis de serem tratados. Os pacientes admitidos com recidiva de tumores tratados em outro serviço apresentaram 15,4% de recidivas após o tratamento no HACC, enquanto os que receberam o primeiro tratamento no HACC apresentaram 5,7% de recidivas, porém sem significância estatística ( $p=0,387$ ). Com uma amostra maior, provavelmente poderia haver diferença estatística.



Fonte: HAFNER et al. (2008)

**Figura 38** - Diferença de representação das margens cirúrgicas. Acima, amostragem completa da margem e abaixo secção transversal com amostragem parcial do espécime cirúrgico

O DFSP quando tratado da maneira convencional, deve ser excisado com margens de segurança de 3 cm. Nesta amostra, apenas 52,5% dos pacientes tiveram o tumor excisado com esta margem, e isto mostrou ser um fator de impacto na recidiva, pois os tumores ressecados com margens inferiores a 3 cm tiveram recidiva de 19,2% contra 0% dos tumores ressecados com pelo menos 3 cm ( $p=0,014$ ). Observa-se que nestes pacientes tratados com margens de 3cm não houve recidiva, porém muitos estudos demonstram que mesmo utilizando margens amplas como esta

pode-se ter até 15% de recidiva.

Quando comparado pacientes com tumores ressecados com margens de segurança de pelo menos 2 centímetros e pacientes com ressecções com margens de segurança menor que 2 cm, foi detectado 2,4% de recidivas contra 25% respectivamente ( $p=0,018$ ). Esta análise sugere que margens de segurança de 2 cm podem ser suficientes para o tratamento do DFSP, o que está em desacordo com a tendência de tratar estes tumores com margens de segurança de pelo menos 3 cm.

Apesar de alguns estudos mostrarem altas taxas de recidiva mesmo com margens de segurança amplas, outros estudos com ressecções com margens inferiores a 3 cm têm mostrado baixas taxas de recidivas, provavelmente à análise mais minuciosa de toda a circunferência da amostra (RATNER et al. 1997). Assim, em pontos específicos em que há projeção do tumor, é possível ampliar apenas a área comprometida, poupando tecidos em áreas que encontram-se livres à análise. Com isso é possível inferir que não há um valor de margem de segurança que seja adequado, e sim um método cirúrgico que permita identificar as áreas comprometidas após ressecção.

Quando comparado os pacientes de acordo com as margens de segurança em até 1,9cm, 2 a 2,9cm e 3cm ou mais, observou-se diferença estatística significativa entre o grupos, confirmando que o valor das margens de segurança influem nas taxas de recidiva ( $p=0,01$ ).

A maior parte dos tumores (52,5%) encontravam-se no tronco. A localização não mostrou interferência no prognóstico entre os pacientes

avaliados, mesmo nos casos de cabeça e pescoço em que margens de segurança amplas são mais difíceis de se atingir. Geralmente tumores nesta localização tendem a ter uma maior chance de recidiva.  $P=0,326$ .

### **5.3 RADIOTERAPIA**

Nesta análise, 9,8% dos pacientes realizaram radioterapia após o tratamento cirúrgico e 90,2% receberam tratamento cirúrgico isolado. Os pacientes que realizaram radioterapia adjuvante apresentaram maior taxa de recidiva que os pacientes com tratamento cirúrgico isolado, 50% contra apenas 5,5% dos pacientes que não realizaram radioterapia ( $p=0,01$ ). Apesar de a radioterapia não ser utilizada rotineiramente no DFSP por se tratar de um tumor de baixo grau, alguns trabalhos tem mostrado benefícios em casos selecionados. Nesta amostra em que os pacientes com radioterapia tiveram pior evolução, isto provavelmente ocorreu pois estes pacientes foram selecionados para radioterapia por apresentarem ressecções insatisfatórias, logo esperava-se que tivessem uma evolução mais desfavorável.

- **FISH**

A pesquisa por FISH da translocação no pacientes desta amostra mostrou que 77,8% dos paciente analisados apresentavam a mutação. Este valor é menor que os valores relatados na literatura que é de 90%. Avaliando o prognóstico dos pacientes com e sem a translocação, observou-

se que a taxa de recidiva nos pacientes mutados foi de 5,7%, contra 30% nos pacientes sem a translocação ( $p=0,065$ ). Embora sem significância estatística, percebe-se uma tendência a maior taxa de recidiva nos pacientes sem a mutação. Com um número maior de pacientes analisados seria possível uma melhor conclusão em relação ao status da mutação e sua associação com a recorrência. Pensando nisto, foi realizado o cálculo da quantidade necessária de casos para se obter resultado significativo, logo considerando um erro  $\alpha=5\%$  e um  $\beta=20\%$ , seriam necessários em cada braço 36 casos (considerando todos os casos) ou 75 casos (considerando somente os casos com margem  $< 3\text{cm}$ ). Não foi encontrado na literatura nenhum estudo que realizou análise da presença da mutação em relação ao risco de recidiva. A frequência de 22,2% dos pacientes pesquisados não apresentavam a mutação. Este dado é importante pois há pacientes recebendo imatinib para tratamento do DFSP, porém não há no Brasil sondas para a detecção desta translocação.

Limitando a amostra aos pacientes com margem de segurança menor que 3 cm, também não se encontrou relação com a recidiva, fato já esperado devido ao número reduzido da amostra.

Visto que 22,2% dos pacientes não apresentaram translocação nesta amostra, vale ressaltar que no Brasil não há sondas de FISH para a detecção desta mutação e selecionar os pacientes com maior chance de resposta ao imatinib.

#### **5.4 MARCADORES DE INVASIVIDADE**

- **MMP1 MMP9 MMP14**

O DFSP é um tumor com grande invasividade local apesar da baixa taxa de metástases a distância. Devido a característica de crescimento deste tumor, poderia ser esperado alguma influência destas proteínas de invasão, porém não foi detectada relação deste marcador com as recidivas, mesmo quando limitando a amostra aos pacientes com com ressecções menores que 3 cm de margem de segurança. Interessante neste tumor que as metaloproteinases encontram-se pouco expressas, enquanto que no dermatofibroma existe uma expressão mais significativa destas proteínas, porém no dermatofibrossarcoma, a expressão de metaloproteinases concentra-se na microvasculatura das regiões mais profundas e invasivas deste tumor (WEINRACH et al. 2004).

## **5.5 MARCADORES DE APOPTOSE**

- **BCL-2, FAS, FASL, CASPASE 8, CASPASE 9, APAF-1 e BAX**

Foram realizadas análises de indutores e inibidores da apoptose. Proteínas supressoras da apoptose como o Bcl-2 quando expressas no tumor prolongam a vida da célula tumoral bloqueando a apoptose (HOCKENBERY et al. 1990). Este mecanismo relaciona-se com tumores de maior grau, progressão de doença e alto índice mitótico, porém a relação com o prognóstico ainda é controversa (SASATOMI et al. 1996; MCMENAMIN et al. 1997; SOINI et al. 1998; BERARDO et al. 1998). Estes

marcadores também não mostraram relação com a recidiva tumoral, porém quando limitada a amostra em pacientes com margens de ressecção menores que 3 cm, o FASL mostrou relação com a recorrência ( $p=0,048$ ), fato controverso pois o FASL tem a função de induzir a apoptose, logo não se espera que uma proteína que induza a apoptose esteja relacionada com pior prognóstico (BELLANCE et al. 2009).

- **KI67**

O DFSP apesar do baixo índice mitótico, tende a apresentar alta agressividade local. O Ki67 avalia o índice de proliferação celular e serve como fator prognóstico em diversos tumores, porém neste estudo não houve interferência do Ki67 na recidiva (LADSTEIN et al. 2010).

- **CD34**

O CD34 é o principal marcador característico do DFSP. Quando há transformação fibrossarcomatosa há uma tendência à negatificação deste marcador. Estes tumores transformados e com grau intermediário de diferenciação tem um prognóstico pior e com maior chance de metástases. Fazendo uso desta lógica poderia-se esperar que a positividade e intensidade do CD34 interferisse no prognóstico, porém isto não ocorreu.

Fica evidente que o DFSP é um tumor de difícil estudo. O principal motivo é número escasso de casos. Por seu um tumor que muitas vezes é excisado completamente na biópsia inicial, e que o tratamento é muito variado de acordo com cada instituição, perde-se muitos parâmetros para

uma análise adequada dos casos. Neste trabalho o tamanho do tumor e a invasividade tumoral não puderam ser avaliados. A avaliação de sobrevida livre de doença por Kaplan-Meyer também não foi factível devido ao número pequeno de casos e recidivas.

Ocorreram apenas 3 (4,91%) óbitos entre estes pacientes, sendo apenas 1 (1,6%) relacionada com o dermatofibrossarcoma. Isto mostra a baixa letalidade deste tumor.

## 6 CONCLUSÕES

- As margens cirúrgicas mostraram correlação com a recorrência em pacientes com dermatofibrossarcoma, porém margens de segurança de 2 cm foram aceitáveis para o tratamento, ao contrário da recomendação tradicional de 3cm.
- Margens menores que 2 cm estão relacionadas com maior taxa de recorrência.
- De acordo com a literatura e os dados deste estudo, devido a característica do DFSP (padrão de invasão em tentáculos, altas taxas de recorrências), provavelmente não existe um valor de margem que seja adequada para ressecção, e sim uma técnica mais adequada em que as margens são avaliadas de forma mais fidedigna.
- Dentre os marcadores imunoistoquímicos pesquisados, apenas o FASL correlacionou-se com taxa de recorrência em pacientes tratados com margens de segurança menores que 3 cm.
- Pacientes com história prévia de recidiva quando tratados no HACC apresentaram maior taxa de recidiva porém sem significância estatística.
- A presença da translocação cromossômica parece ter influência na recidiva local, porém é necessário uma amostra maior para uma análise estatística mais fidedigna.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott JJ, Erickson-Johnson M, Wang X, Nascimento AG, Oliveira AM. Gains of COL1A1-PDGFB genomic copies occur in fibrosarcomatous transformation of dermatofibrosarcoma protuberans. **Mod Pathol** 2006; 19:1512-8.

Ballo MT, Zagars GK, Pisters P, Pollack A. The role of radiation therapy in the management of dermatofibrosarcoma protuberans. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1998; 40:823-7.

Bellance N, Lestienne P, Rossignol R, et al. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. **Front Biosci** 2009; 14:4015-34.

Berardo MD, Elledge RM, de Moor C, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma. **Cancer** 1998; 82:1296-302.

Bowne WB, Antonescu CR, Leung DH, et al. Dermatofibrosarcoma protuberans: a clinicopathologic analysis of patients treated and followed at a single institution. **Cancer** 2000; 88:2711-20.

Bridge JA, Neff JR, Sandberg AA. Cytogenetic analysis of dermatofibrosarcoma protuberans. **Cancer Genet Cytogenet** 1990; 49:199-202

Connelly JH, Evans HL. Dermatofibrosarcoma protuberans. A clinicopathologic review with emphasis on fibrosarcomatous areas. **Am J Surg Pathol** 1992; 16:921-5.

Criscione VD, Weinstock MA. Descriptive epidemiology of dermatofibrosarcoma protuberans in the United States, 1973 to 2002. **J Am Acad Dermatol** 2007; 56:968-73.

Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. **Am J Surg Pathol** 1997; 21:88-101.

Duprat Neto JP. **Análise histológica, de marcadores tumorais e da angiogênese no melanoma com disseminação regional.** São Paulo; 1997. [Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Farma JM, Ammori JB, Zager JS, et al. Dermatofibrosarcoma protuberans: how wide should we resect? **Ann Surg Oncol** 2010; 17:2112-8.

Fields RC, Hamed M, Qin LX, et al. Dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP): predictors of recurrence and the use of systemic therapy. **Ann Surg Oncol** 2011; 18:328-36.

Fina L, Molgaard HB, Robertson D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. **Blood** 1990; 75:2417-26.

Goldemberg S, Santos OLR, Moreira AM, et al. Dermatofibrossarcoma protuberante. **J Bras Med** 1994; 67:19-36.

Goldblum JR, Tuthill RJ. CD34 and factor-XIIIa immunoreactivity in dermatofibrosarcoma protuberans and dermatofibroma. **Am J Dermatopathol** 1997; 19:147-53.

Häfner HM, Moehrle M, Eder S, Trilling B, Röcken M, Breuninger H. 3D-Histological evaluation of surgery in dermatofibrosarcoma protuberans and malignant fibrous histiocytoma: Differences in growth patterns and outcome. **Eur J Surg Oncol** 2008; 34:680-6.

Hakem R, Hakem A, Duncan GS, et al. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. **Cell** 1998; 94:339-52.

Hall PA, Levison DA. Review: assessment of cell proliferation in histological material. **J Clin Pathol** 1990; 43:184-92.

Han A, Chen EH, Niedt G, Sherman W, Ratner D. Neoadjuvant imatinib therapy for dermatofibrosarcoma protuberans. **Arch Dermatol** 2009; 145:792-6.

Hannink M, Donoghue DJ. Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins. **Biochim Biophys Acta** 1989; 28:1-10.

Heldin CH. Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. **EMBO J** 1992; 11:4251-9.

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

Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature** 1990; 348:334-36.

His ED, Nickoloff BJ. Dermatofibroma and dermatofibrosarcoma protuberans: an immunohistochemical study reveals distinctive antigenic profiles. **J Dermatol Sci** 1996 11:1-9.

Inazawa J, Itoh N, Abe T, Nagata S. Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. **Genomics** 1992; 14:821-2.

Johnson-Jahangir H, Ratner D. Advances in management of dermatofibrosarcoma protuberans. **Dermatol Clin** 2011; 29:191-200.

Kérob D, Porcher R, Vérola O, et al. Imatinib mesylate as a preoperative therapy in dermatofibrosarcoma: results of a multicenter phase II study on 25 patients. **Clin Cancer Res** 2010; 16:3288-95.

Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer** 1994; 73:2013-26.

Kim HJ, Lee JY, Seo YJ, et al. Stromelysin-3 expression in the differential diagnosis of dermatofibroma and dermatofibrosarcoma protuberans: comparison with factor XIIIa and CD34. **Br J Dermatol** 2007; 157:319-24.

Kondapalli L, Soltani K, Lacouture ME. The promise of molecular targeted therapies: protein kinase inhibitors in the treatment of cutaneous malignancies. **J Am Acad Dermatol** 2005; 53:291-302.

Kuida K, Haydar TF, Kuan CY. et al. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. **Cell** 1998; 94:325-37.

Ladstein RG, Bachmann IM, Straume O, et al. Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. **BMC Cancer** 2010; 10:140.

Lemm D, Mügge LO, Mentzel T, Höffken K. Current treatment options in dermatofibrosarcoma protuberans. **J Cancer Res Clin Oncol** 2009; 135:653-65.

Linn SC, West RB, Pollack JR. Gene expression patterns and gene copy number changes in dermatofibrosarcoma protuberans. **Am J Pathol** 2003; 163:2383-95.

Macedo JL, Barbosa GS, Rosa SC, et al. Dermatofibrossarcoma protuberante / Dermatofibrosarcoma protuberans. **Rev Bras Cir Plast** 2008; 23:138-43.

Macarenco RS, Nascimento AG, Oliveira AM, et al. Genomic gains of COL1A1-PDFGB occur in the histologic evolution of giant cell fibroblastoma into dermatofibrosarcoma protuberans. **Genes Chromosomes Cancer** 2008; 47:260-5.

Mandahl N, Heim S, Willén H, et al. Supernumerary ring chromosome as the sole cytogenetic abnormality in a dermatofibrosarcoma protuberans. **Cancer Genet Cytogenet** 1990; 49:273-5.

Massey RA, Tok J, Strippoli BA, Szabolcs MJ, Silvers DN, Eliezri YD. A comparison of frozen and paraffin sections in dermatofibrosarcoma protuberans. **Dermatol Surg** 1998; 24:995-8.

McArthur GA, Demetri GD, van Oosterom A, et al. Molecular and clinical analysis of locally advanced dermatofibrosarcoma protuberans treated with imatinib: imatinib target exploration consortium study B2225. **J Clin Oncol** 2005; 23:866-73.

McMenamin ME, O'Neill AJ, Gaffney EF. Et al. Extent of apoptosis in ovarian serous carcinoma: relation to mitotic and proliferative indices, p53 expression, and survival. **Mol Pathol** 1997; 50:242-46.

Mendoza CB Jr, Gerwig WH Jr, Watne AL. Dermatofibrosarcoma protuberans with metastases treated with methotrexate. **Am J Surg** 1970; 120:119-21.

Mendenhall WM, Zlotecki RA, Scarborough MT. Dermatofibrosarcoma protuberans. **Cancer** 2004; 101:2503-08

Mentzel T, Beham A, Katenkamp D, Dei Tos AP, Fletcher CD. Fibrosarcomatous ("high-grade") dermatofibrosarcoma protuberans: clinicopathologic and immunohistochemical study of a series of 41 cases with emphasis on prognostic significance. **Am J Surg Pathol** 1998; 22:576-87.

Mohs FE. Chemosurgery: a microscopically controlled method of cancer excision. **Arch Surg** 1941; 42:279-95.

Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. **Annu Rev Genet** 1999; 33:29-55.

Nakanishi G, Lin SN, Asagoe K, et al. A novel fusion gene of collagen type I alpha 1 (exon 31) and platelet-derived growth factor B-chain (exon 2) in dermatofibrosarcoma protuberans. **Eur J Dermatol** 2007; 17:217-9.

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

Nickoloff BJ. The human progenitor cell antigen (CD34) is localized on endothelial cells, dermal dendritic cells, and perifollicular cells in formalin-fixed normal skin, and on proliferating endothelial cells and stromal spindle-shaped cells in Kaposi's sarcoma. **Arch Dermatol** 1991; 127:523-9.

O'Bryan KW, Ratner D. The role of targeted molecular inhibitors in the management of advanced nonmelanoma skin cancer. **Semin Cutan Med Surg** 2011; 30:57-61.

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

Patel KU, Szabo SS, Hernandez VS, et al. Dermatofibrosarcoma protuberans COL1A1-PDGFB fusion is identified in virtually all dermatofibrosarcoma protuberans cases when investigated by newly developed multiplex reverse transcription polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization assays. **Hum Pathol** 2008; 39:184-93.

Ratner D, Thomas CO, Johnson TM, et al. Mohs micrographic surgery for the treatment of dermatofibrosarcoma protuberans. Results of a multiinstitutional series with an analysis of the extent of microscopic spread. **J Am Acad Dermatol** 1997; 37:600-13.

Rubin BP, Schuetze SM, Eary JF, et al. Molecular targeting of platelet-derived growth factor B by imatinib mesylate in a patient with metastatic dermatofibrosarcoma protuberans. **J Clin Oncol** 2002; 20:3586-91.

Rutkowski P, Van Glabbeke M, Rankin CJ, et al. Imatinib mesylate in advanced dermatofibrosarcoma protuberans: pooled analysis of two phase II clinical trials. **J Clin Oncol** 2010; 28:1772-9.

Rutkowski P, Wozniak A, Switaj T. Advances in molecular characterization and targeted therapy in dermatofibrosarcoma protuberans. **Sarcoma** 2011; 2011:959132.

Sasatomi E, Tokunaga O, Miyazaki K. et al. Spontaneous apoptosis in gallbladder carcinoma. Relationships with clinicopathologic factors, expression of E-cadherin, bcl-2 protooncogene, and p53 oncosuppressor gene. **Cancer** 1996; 78:2101-10

Sato N, Kimura K, Tomita Y, et al. Recurrent dermatofibrosarcoma protuberans with myxoid and fibrosarcomatous changes paralleled by loss of CD34 expression. **J Dermatol** 1995; 22:665-72.

Sawhney N, Hall PA. Ki67--structure, function, and new antibodies. **J Pathol** 1992; 168:161-2.

Sheikh MS, Fornace AJ Jr Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis **Leukemia** 2000; 14:1509-13.

Sirvent N, Maire G, Pedeutour. Genetics of Dermatofibrosarcoma Protuberans Family of Tumors: From Ring Chromosomes to Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment. **Genes, Chromosomes & Cancer** 2003; 37:1–19

Sjöblom T, Shimizu A, O'Brien KP, et al. Growth inhibition of dermatofibrosarcoma protuberans tumors by the platelet-derived growth factor receptor antagonist STI571 through induction of apoptosis. **Cancer Res** 2001; 61:5778-83.

Soini Y, Pääkkö P, Lehto VP. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. **Am J Pathol** 1998; 153:1041-53.

Sondak VK, Cimmino VM, Lowe LM, et al. Dermatofibrosarcoma protuberans: what is the best surgical approach? **Surg Oncol** 1999; 8:183-9.

Suit H, Spiro I, Mankin HJ et al. Radiation in management of patients with dermatofibrosarcoma protuberans. **J Clin Oncol** 1996; 14:2365-9.

Susin SA, Zamzami N, Castedo M, et al. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. **J Exp Med** 1997; 186:25-37.

Suster S, Fisher C, Moran CA. Expression of bcl-2 oncoprotein in benign and malignant spindle cell tumors of soft tissue, skin, serosal surfaces, and gastrointestinal tract. **Am J Surg Pathol** 1998; 22:863-72.

Szollosi Z, Scholtz B, Egervari K, et al. Transformed dermatofibrosarcoma protuberans: real time polymerase chain reaction detection of COL1A1-PDGFB fusion transcripts in sarcomatous areas. **J Clin Pathol** 2007; 60:190-4.

Takahira T, Oda Y, Tamiya S, et al. Microsatellite instability and p53 mutation associated with tumor progression in dermatofibrosarcoma protuberans. **Hum Pathol** 2004; 35:240-5.

Terrier-Lacombe MJ, Guillou L, Maire G, et al. Dermatofibrosarcoma protuberans, giant cell fibroblastoma, and hybrid lesions in children: clinicopathologic comparative analysis of 28 cases with molecular data--a study from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. **Am J Surg Pathol** 2003; 27:27-39.

Traweek ST, Kandalaf PL, Mehta P, et al. The human hematopoietic progenitor cell antigen (CD34) in vascular neoplasia. **Am J Surg Pathol** 1991; 96:25-31.

Tromovitch TA, Stegeman SJ. Microscopically controlled excision of skin tumors. **Arch Dermatol** 1974; 110:231-2.

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

Thewes M, Worret WI, Engst R, et al. Stromelysin-3 (ST-3): immunohistochemical characterization of the matrix metalloproteinase (MMP)-11 in benign and malignant skin tumours and other skin disorders. **Clin Exp Dermatol** 1999; 24:122-6.

Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. **Science** 2002; 31:1635-6.

Wang J, Hisaoka M, Shimajiri S, et al. Detection of COL1A1-PDGFB fusion transcripts in dermatofibrosarcoma protuberans by reverse transcription-polymerase chain reaction using archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Diagn Mol Pathol** 1999; 8:113-19.

Weinrach DM, Wang KL, Wiley EL, et al. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 9, and 14 in dermatofibrosarcoma protuberans and common fibrous histiocytoma (dermatofibroma). **Arch Pathol Lab Med** 2004; 128:1136-41.

Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, et al. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. **Biochim Biophys Acta** 2011; 1813:521-31.

White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. **Gene Dev** 1996; 10:1-15.

Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL-2 family and cell death. **Blood** 1996; 88:386-401.

**Anexo 1 - Protocolo de Coleta de Dados para Pacientes com Dermatofibrossarcoma Protuberans (DFSP)**

Nome: \_\_\_\_\_

RGH: \_\_\_\_\_ Data de nasc.: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Idade atual: \_\_\_\_\_ Idade ao diagnóstico: \_\_\_\_\_

Número do AP: \_\_\_\_\_

Sexo: .....( )

- (1) feminino
- (2) masculino

Localização: .....( )

- (1) cabeça
- (2) tronco
- (3) membros

Situação no momento da admissão: .....( )

- (1) lesão primária
- (2) lesão em tratamento incompleto/biópsia
- (3) controle e seguimento
- (4) avaliação de metástase
- (5) avaliação para radioterapia

Recorrência antes do A C Camargo.....( )

- (0) não
- (1) sim

Se sim, quantas? \_\_\_\_\_

Data cirurgia para a primeira recorrência fora do AC Camargo: \_\_\_\_\_

Data cirurgia para a segunda recorrência fora do AC Camargo: \_\_\_\_\_

Data cirurgia para a terceira recorrência fora do AC Camargo: \_\_\_\_\_

Cirurgia no A C Camargo (data): \_\_\_\_\_

Margem: .....( )

(0) menor que 3 cm

(1) 3cm ou mais

Margem: .....( )

(1) até 1,9 cm

(2) de 2 a 2,9 cm

(3) 3 cm ou >

(99) desconhecida

Tipo de reconstrução:.....( )

(1) enxerto

(2) retalho

(3) sutura simples

(99) desconhecida

Tempo para recorrência 1 (em meses): \_\_\_\_\_

Data da cx 1: \_\_\_\_\_

Tempo para recorrência 2 (em meses): \_\_\_\_\_

Data cx 2: \_\_\_\_\_

Tempo para recorrência 3 (em meses): \_\_\_\_\_

Data cx 3: \_\_\_\_\_

Tempo para recorrência 4 (em meses): \_\_\_\_\_

Data cx 4: \_\_\_\_\_

Tempo para recorrência 5 (em meses): \_\_\_\_\_

Data cx 5: \_\_\_\_\_

Data da última cirurgia: \_\_\_\_\_

Fez tratamento com radioterapia: .....( )

(0) não

(1) sim

(99) desconhecido

Realizado USG?.....( )

(0) não

(1) sim

(99) desconhecido

Realizada Tomografia Computadorizada:.....( )

(0) não

(1) sim

(99) desconhecido

Realizada Ressonância Magnética:.....( )

(0) não

(1) sim

(99) desconhecido

Data da última consulta: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Status:

1 vivo sem doença

2 vivo com doença

3 óbito por câncer, especificar

4 óbito por outras causas

99 desconhecido