

**EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS VEGFR1, PPARG,
FABP4, IMP3, TFE3 e IFI16 EM MELANOMAS
CUTÂNEOS EXTENSIVOS SUPERFICIAIS E
LENTIGINOSOS ACRAIS E SUA ASSOCIAÇÃO COM
VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS**

KELLY SIQUEIRA DE SOUZA

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima

Co-Orientador: Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Souza, Kelly Siqueira de

Expressão das proteínas VEGFR1, PPARG, FABP4, IMP3, TFE3 e IFI16 em melanomas cutâneos extensivos superficiais e lentiginosos acrais e sua associação com variáveis clínico-patológicas / Kelly Siqueira de Souza – São Paulo, 2012.

114p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima

Descritores: 1. MELANOMA. 2. MELANÓCITOS. 3. IMUNOISTOQUIMICA.

DEDICATÓRIA

*À DEUS QUE ME DEU A OPORTUNIDADE DE CONCLUIR MAIS UMA ETAPA
NA MINHA CARREIRA PROFISSIONAL;
E A TODOS QUE ME DERAM SUPORTE DURANTE TODO O
DESENVOLVIMENTO DESTE TRABALHO SEI QUE SEMPRE ESTARÃO
TORCENDO POR MIM*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima, pela orientação, atenção, confiança, estando sempre acessível para resolver as dúvidas e todas as intercorrências que surgiram;

Ao meu co-orientador, Dr. Clóvis A. L. Pinto, pela orientação, colaboração, sugestões e leitura das lâminas de imunoistoquímica;

Ao Dr. Gilles Landman e a Dra Bianca Sá, por cederem as planilhas de dados e o TMA;

À Aline, pelo suporte com a estatística deste trabalho;

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital A.C. Camargo pela ajuda na seleção dos prontuários;

À Sueli Nonogaki, funcionária do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, pela realização das reações de imunoistoquímica com a melhor qualidade possível;

À Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente, por todo auxílio prestado. Às sempre solícitas Ana Maria Kuninari, Vanuza e Luciana;

Aos Membros da Banca de Qualificação, Dra. Mirian Nacagami Sotto e Dra. Gisele Gargantini Rezze, pela colaboração e por todas as sugestões que auxiliaram à execução deste estudo;

À Ana Cláudia Machado, à Andrea de Moraes Carvalho e à Camila Miranda pelo incentivo constante nos momentos de tensão e de descontração, foi muito bom conhecer vocês;

À Mariana Petaccia pela boa vontade em ajudar com o escaneamento das lâminas de imunoistoquímica no Aperio;

Ao Severino da Silva, ao Carlos Eugênio e o Rômulo Akira, funcionários do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, pelo trabalho na confecção das lâminas para imunoistoquímica, por disponibilizarem os mapas e os blocos de TMA;

À CAPES, pelo auxílio financeiro;

Ao CEPID, Centro de Pesquisa Inovação e Difusão do Centro Antônio Prudente para Pesquisa e Tratamento do Câncer, e ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo pelo financiamento do projeto;

Gostaria de expressar minha gratidão a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a execução, aprendizado e o aperfeiçoamento das técnicas e das informações que apresentamos nessa dissertação, aos que me ensinaram, acreditaram e confiaram na nossa pesquisa proporcionando-me a oportunidade de realizá-la. Sem o apoio de todos isso jamais seria possível;

Finalmente, desejo expressar o meu mais profundo e respeitoso agradecimento aos nossos pacientes, com os quais aprendemos mais do que em todos os artigos que conseguimos ler.

Muito Obrigada!

RESUMO

Souza KS. **Expressão das Proteínas VEGFR1, PPARG, FABP4, IMP3, TFE3 e IFI16 em melanomas cutâneos extensivos superficiais e lentiginosos acrais e sua associação com variáveis clínico-patológicas.** São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Introdução: Nosso grupo de pesquisa identificou previamente um conjunto de genes associados com resposta ao tratamento com melfalano e TNF num modelo de melanoma murino. Acreditamos que a avaliação da expressão das proteínas codificadas por estes genes em amostras de melanoma humano e sua correlação com características clínicas e patológicas podem ser de considerável relevância para melhor compreensão da biologia do tumor e para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para esta neoplasia. **Objetivo.** Avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas VEGFR1, PPARG, FABP4, IMP3, TFE3 e IFI16 em melanomas cutâneos extensivos superficiais e lentiginosos acrais. **Materiais e Métodos:** Estudo de coorte retrospectiva, incluindo 136 pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo do tipo extensivo superficial e 43 pacientes com diagnóstico de melanoma do tipo acral-lentiginoso, cujos blocos de parafina do tumor primário e metastático estavam disponíveis nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica. Através da reação de imunoistoquímica foram analisadas a expressão dos marcadores e avaliada associação estatística com os dados clínico-patológicos atualizados dos pacientes. **Resultados:** Sessenta por cento da amostra era do sexo feminino e 86,4,% de cor branca. A idade média dos pacientes foi de 55,24 anos. As lesões foram mais frequentemente encontradas no tronco, (35,6%), seguido dos pés (23,3%). Noventa e dois por cento das lesões estavam em fase de crescimento vertical, e a maioria não apresentava regressão (85,9%), nem ulceração (67,8%). O tamanho médio das lesões foi de 2,26 cm (mediana). A maior parte dos pacientes apresentava lesões profundas, com índice de Breslow médio de 3,47mm e nível de Clark III em 41,0% dos casos. FABP4 mostrou imunomarcação em 80% dos casos, TFE3 em 44%, VEGFR1 esteve expresso em 58% dos casos, IFI16 em 54% das

amostras e a expressão de PPARG foi observada em 75% dos casos. Não foi possível avaliar a expressão de IMP3. A expressão destes marcadores não influenciou de maneira significativa nem a sobrevida global, nem a sobrevida livre de doença. O tipo extensivo superficial, Breslow $\leq 2,0$ mm, ausência de acometimento linfonodal, estágio inicial, Clark $\leq$ III e ausência de ulceração estiveram associados com maior sobrevida global na análise univariada. Estádio inicial, Breslow $\leq 2,0$ mm, ausência de acometimento linfonodal, Clark $\leq$ III e ausência de ulceração estiveram associados com maior sobrevida livre de doença na análise univariada. Nenhum dos marcadores se correlacionou com sobrevida global ou livre de doença na análise univariada. Na análise multivariada, PPARG e o Breslow estiveram associados com sobrevida global como fatores independentes, bem como PPARG e estágio com sobrevida livre de doença. **Conclusões:** Todos os marcadores mostraram associação com estádios iniciais (*in situ* e I) e com o tipo extensivo superficial. PPARG, juntamente com Breslow e estágio, é um fator prognóstico independente para sobrevida global e livre de doença, respectivamente.

SUMMARY

Souza KS. [Protein expression of VEGFR1, PPARG, FABP4, IMP3, TFE3 and IFI16 in superficially spreading and lentiginous acral cutaneous melanoma and its association with clinicopathologic characteristics]. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Background: We have previously identified a set of genes differentially expressed after treatment with melphalan and TNF in murine melanoma model. We believe that evaluating the expression of proteins codified by these genes in samples of human melanoma and correlating it with clinical and pathologic features may be of relevance to better understanding of tumor biology and the development of new treatment strategies for this neoplasm. **Objective:** To evaluate the immunohistochemical expression of VEGFR1, PPARG, FABP4, IMP3, TFE3 and IFI16 in superficially spreading (SS) and lentiginous acral (LA) cutaneous melanomas. **Materials and methods:** A retrospective cohort study including 136 patients diagnosed with cutaneous melanoma of the SS type and 43 patients diagnosed with melanoma, LA type, whose paraffin blocks of primary tumor and metastases were available in the archives of the Department of Pathology. The expression of the selected markers was analyzed by immunohistochemical reaction and its statistical association with the updated clinical and pathological data of patients was evaluated. **Results:** Sixty percent of the sample was female and 86.4% white. The medium age of patients was 55.24 years. The lesions were more frequently found in the trunk (35.6%), followed by the feet (23.3%). Ninety-two percent of the lesions were in the vertical growth phase, and most of them showed no regression (85.9%) or ulceration (67.8%). The medium size of the lesions was 2.26 cm. Most patients had thick lesions, with mean Breslow thickness of 3.47 mm and Clark level III in 41.0% of cases. FABP4 showed immunostaining in 80% of cases, TFE3 in 44%, VEGFR1 was expressed in 58% of cases, IFI16 in 54% of the samples and the expression of PPARG was observed in 75% of cases. It was not possible to evaluate the expression of IMP3. The expression of these markers did not influence

significantly overall survival neither disease-free survival. The SS type, Breslow $\leq$ 2.0 mm, absence of lymph node involvement, early stage, Clark $\leq$ 3 and absence of ulceration were associated with increased overall survival in univariate analysis. Initial stage, Breslow $\leq$ 2.0 mm, absence of lymph node involvement, Clark $\leq$ 3 and absence of ulceration were associated with increased disease-free survival in univariate analysis. None of the markers correlated with overall survival or disease-free in the univariate analysis. In multivariate analysis, Breslow and PPARG were associated with overall survival as independent factors, as well as PPARG and staging with disease-free survival. **Conclusions:** All markers showed association with early staging (*in situ* and stage I) and the SS type. PPARG, along with Breslow and stage, is an independent prognostic factor for overall survival and disease free survival, respectively.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Expressão nuclear de IFI16.....	50
Figura 2	Expressão citoplasmática de FABP4.....	52
Figura 3	Expressão nuclear de TFE3.....	52
Figura 4	Expressão citoplasmática de VEGFR1.....	55
Figura 5	Expressão nuclear de PPARG.....	56
Figura 6	Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão de IFI16.....	64
Figura 7	Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão de FABP4.....	65
Figura 8	Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão de TFE3.....	66
Figura 9	Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão de VEGFR1.....	67
Figura 10	Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão de PPARG.....	68
Figura 11	Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com Nível de Clark.....	69
Figura 12	Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com a ulceração.....	70

Figura 13	Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com tipo de melanoma (acral x extensivo superficial).....	71
Figura 14	Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com estágio (no estágio I foram agrupados também os melanomas in situ).....	72
Figura 15	Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com a espessura de Breslow.....	73
Figura 16	Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com o acometimento linfonodal.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Painel de anticorpos utilizados.....	42
Tabela 2	Distribuição dos pacientes com diagnóstico de melanoma quanto as características demográficas.....	47
Tabela 3	Distribuição dos pacientes com diagnóstico de melanoma em relação as características patológicas.....	48
Tabela 4	Distribuição da expressão dos diversos marcadores no TMA.....	49
Tabela 5	Associação entre as características clínico-patológicas dos tumores com a expressão de IFI16.....	51
Tabela 6	Associação entre as características clínico-patológicas dos tumores com a expressão de FABP4.....	53
Tabela 7	Associação entre as características clínico-patológicas dos tumores com a expressão de TFE3.....	54
Tabela 8	Associação entre as características clínico-patológicas dos tumores com a expressão de VEGFR1.....	57
Tabela 9	Associação entre as características clínico-patológicas dos tumores com a expressão de PPARG.....	58
Tabela 10	Associação de IFI16 com os demais marcadores, excluindo os melanomas <i>in situ</i>	59
Tabela 11	Associação de FABP4 com os demais marcadores, excluindo os melanomas <i>in situ</i>	60

Tabela 12	Associação de TFE3 com os demais marcadores, excluindo os melanomas <i>in situ</i>	60
Tabela 13	Associação de VEGFR1 com PPARG, excluindo os melanomas <i>in situ</i>	61
Tabela 14	Associação de IFI16 com os demais marcadores, incluindo os melanomas <i>in situ</i>	61
Tabela 15	Associação de FABP4 com os demais marcadores, incluindo os melanomas <i>in situ</i>	62
Tabela 16	Associação de TFE3 com os demais marcadores, incluindo os melanomas <i>in situ</i>	63
Tabela 17	Associação de VEGFR1 com PPARG, incluindo os melanomas <i>in situ</i>	63
Tabela 18	Análise multivariada da influência das variáveis clínico-patológicas sobre a sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD).....	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
mm	milímetros
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
>	maior
<	menor
AIM2	Absent in Melanoma 2
AJCC	American Joint Committee on Cancer
DAB	3” Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EUA	United States of America
FABP4	Fatty acid binding-protein 4
FLT1	FMS-like tyrosine kinase 1
IFI16	Interferon induced protein 16
IMP3	Insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein 3
LBP s	lipid-binding proteins
LNS	Linfonodo sentinela
MEL	Melfalano
MITF	Microphthalmia Transcription Factor
MMSS	Membros Superiores
MMII	Membros Inferiores
mRNA	Messenger RNA
NCI	National Cancer Institute
NFκB	Nuclear factor NF-kappa-B
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PIGF	Placenta growth factor

PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
qRT-PCR	Real-Time quantitative Reverse Transcription PCR
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
TFE3	Transcription factor E3
TK	<i>Tyrosine</i> Kinase
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TNF	Tumor Necrosis Factor
VEGFR1	Vascular endothelial growth factor receptor-1

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Os Melanócitos	1
1.2	Neoplasias Melanocíticas.....	3
1.3	Fases de Crescimento e Subtipos de Melanoma	5
1.3.1	Lesões Intermediárias: Melanoma em Fase de Crescimento Radial (Melanoma de Disseminação Superficial)	5
1.3.2	Melanoma em Fase de Crescimento Vertical	6
1.3.3	Melanoma Nodular	8
1.3.4	Melanoma Lentigo Maligno.....	8
1.3.5	Melanoma Acral Lentiginoso.....	9
1.3.6	Melanoma Extensivo Superficial	10
1.4	Fatores Prognósticos	12
1.5	Expressão Gênica em Melanomas Cutâneos – Técnicas para Estudo	17
1.6	VEGFR1	19
1.7	FABP4.....	22
1.8	PPARG.....	24
1.9	IMP3	25
1.10	IFI202 (IFI16)	27
1.11	TFE3	30
1.12	<i>Tissue microarrays</i> (TMAs)	31
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	Objetivo Geral.....	34
3.2	Objetivos Específicos.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	Desenho do Estudo	35

4.1.1	Critérios de Inclusão	35
4.1.2	Critérios de Exclusão	36
4.2	Dados demográficos e clínicos	36
4.3	Análise Histológica	38
4.4	Confecção dos <i>Tissue microarrays</i> – <i>TMA</i> s.....	38
4.5	Análise Imunoistoquímica	40
4.6	Leitura das Lâminas	43
4.7	Análise Estatística	44
5	RESULTADOS	46
5.1	Características clínicas e demográficas da amostra	46
5.2	Expressão dos marcadores imunoistoquímicos (FABP4, IFI16, TFE3, VEGFR1, PPARG, IMP3)	49
5.3	Sobrevida global e sobrevida livre de doença.....	64
6	DISCUSSÃO.....	77
7	CONCLUSÃO.....	96
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

ANEXOS

Anexo 1 Ficha de coleta de dados melanoma superficial

Anexo 2 Ficha de coleta de dados melanoma acral

Anexo 3 Análise dos dados do estudo, excluindo-se os melanomas *in situ*

1 INTRODUÇÃO

A pele funciona como uma barreira protetora, controlando a perda de água, além de ser vital na regulação da temperatura e na proteção contra luz ultravioleta (HARRIST et al. 2002). Ela pode ser dividida em três camadas básicas que são a epiderme (mais superficial), a derme e a hipoderme (subcutânea) (HARRIST et al. 2002).

A epiderme é um epitélio estratificado (mais de uma camada de células), amoldando-se perfeitamente sobre a camada papilar da derme, pavimentoso (células achatadas), queratinizado e avascular. A maioria das células (90%) são queratinócitos que durante seu processo de diferenciação formam células anucleadas, ricas em queratina na superfície da pele. Os 10% restantes são constituídos por melanócitos, células de Langerhans e de Merkel (CHU et al. 2003).

1.1 OS MELANÓCITOS

Os melanócitos são células originárias da crista neural e responsáveis, em grande parte pela síntese de melanina, o pigmento que dá à pele a sua cor natural. Após seguirem uma via migratória mesenquimatosa, assumem localização na epiderme, da oitava semana embrionária em diante, e são as primeiras células imigrantes a chegar nessa localização. Em torno do quarto mês de gestação, começa a síntese de melanina e a transferência dos grânulos sintetizados de pigmento ocorre

em torno do sexto mês. Esse é o começo da pigmentação original de uma pessoa (HARRIST et al. 2002).

Na vida pós-embriônica, os melanócitos residem na camada basal da epiderme, onde tendem a pender da epiderme dentro da derme papilar. Entretanto, são separados da derme pela zona epidérmica da membrana basal. Um determinado melanócito supre dendritos para cerca de 36 queratinócitos, formando um complexo conhecido como unidade epidermo-melanocítica. Há um melanócito para cada 4-10 queratinócitos da camada basal (HARRIST et al. 2002).

Há variação étnica da pigmentação, que se deve a atividade do melanócito e não ao aumento do número destas células. Quando a pele é exposta ao sol, os melanócitos produzem mais pigmento, fazendo com que a pele bronzeie, ou seja, escureça (National Center Institute-NCI 2011).

A grande maioria dos melanócitos localiza-se na pele e apenas uma pequena parte é encontrada em outras regiões do corpo. Portanto, o mais comum é o melanoma ser de origem cutânea (GAMONAL 2002).

Nas colorações de rotina (hematoxilina-eosina), os melanócitos aparecem na camada basal com núcleo basofílico e citoplasma claro, porém podem ser reconhecidos mais facilmente por colorações especiais que revelam melanina, como a de Fontana-Masson, ou por imunoistoquímica (anticorpos que reconhecem antígenos específicos como Melan-A, HMB-45 e S100) (SALVIO e MARQUES 2006).

1.2 NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS

As neoplasias de pele são um paradigma para a compreensão dos cânceres em geral, particularmente porque se sabe que o principal agente carcinogênico na maioria dos cânceres cutâneos é a luz ultravioleta (HARRIST et al. 2002). A patologia da maioria dos estágios de desenvolvimento das neoplasias específicas da pele é conhecida. A pronta disponibilidade de tecido tumoral, oriundo de lesões sequenciais, permite estudos *in vitro* de células tumorais e sua correlação com o comportamento observado das lesões clínicas (HARRIST et al. 2002). Os tumores sólidos, como o melanoma, são constituídos de uma soma variável de células neoplásicas e estromais (fibroblastos, células endoteliais, células imunocompetentes, principalmente macrófagos e linfócitos) (ALLAVENA et al. 2008).

A incidência de melanoma maligno cutâneo está aumentando a uma taxa maior do que a de qualquer outra forma de câncer humano, com um aumento na incidência de aproximadamente 4 a 7% ao ano por década (AGUIAR et al. 2009; PECTASIDES et al. 2009). Seus sítios primários incluem: pele, úvea, mucosas e leptomeninges, sendo a pele o sítio mais comum de acometimento (90%) (WEBER 2007; FECHER et al. 2007).

Estima-se que mais de 1% das crianças nascidas atualmente irão desenvolver melanoma maligno. O prognóstico é excelente se a lesão for reconhecida antes de entrar na fase de crescimento vertical. Entretanto quando o tumor estende-se em profundidade na derme, 75% dos pacientes afetados morrerão de doença metastática (HARRIST et al. 2002).

Segundo dados do *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER 2010) nos EUA, o melanoma é a sexta neoplasia mais incidente, sendo a quinta na população caucasiana, enquanto nas demais etnias é de baixa incidência.

No Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) foi de 5.930 novos casos em 2010, sendo 2.970 casos na população feminina e 2960 casos na população masculina (Ministério da Saúde 2009). As maiores taxas de incidência por estado ocorrem em São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina (Ministério da Saúde 2009). O melanoma é menos frequente do que os outros cânceres de pele (basocelular e carcinoma de células escamosas), no entanto, sua letalidade é mais elevada (Ministério da Saúde 2009).

A descoberta precoce do melanoma é fundamental para possibilitar o controle da doença. O diagnóstico clínico do melanoma invasivo é mais fácil, porque ele apresenta cor variada, aumento de tamanho, irregularidades na superfície, como nódulos ou ferida (ulceração), além de sangramento e prurido (MASCI e BORDEN 2002). Entretanto, melanomas iniciais mostram sinais sutis, não muito fáceis de observar, como irregularidades nas bordas e cores levemente variadas (WEBER et al. 2007).

O risco de morte é maior para os pacientes com o melanoma detectado em fase tardia. A sobrevida em 5 anos para melanoma detectado e tratado em estágio inicial varia de 89 a 95%, mas é de 5 a 10% para aqueles no estágio IV (WEBER 2008), e a sobrevida mediana é de 6 a 9 meses, além disso, as opções de tratamento são limitadas neste estágio (JEMAL et al. 2005; CAMACHO et al. 2009).

Uma das razões para tal insucesso do tratamento parece ser a notória resistência de células de melanoma metastático a agentes citotóxicos convencionais.

Como as células do melanoma são altamente resistentes à quimioterapia convencional, as taxas de sobrevida após a disseminação do tumor continuam pobres e, portanto, há uma necessidade urgente de novas opções terapêuticas (SOENGAS e LOWE 2003).

1.3 FASES DE CRESCIMENTO E SUBTIPOS DE MELANOMA

O melanoma tem quatro subtipos, identificados por suas características histológicas da fase de crescimento radial, isto é, quando cresce horizontalmente e está restrito à epiderme e à derme superior, ou invasivo, quando apresenta crescimento vertical para a derme profunda e pode evoluir com metástases à distância.

CLARK et al. (1969) classificaram o melanoma cutâneo em três subtipos clínico-patológicos: melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma extensivo superficial e, em 1976, REED acrescentou outro subtipo: o melanoma lentiginoso acral (PHAN et al. 2007).

1.3.1 Lesões intermediárias: melanoma em fase de crescimento radial (melanoma de disseminação superficial)

O aparecimento de lesões intermediárias marca o começo da malignidade (melanoma). Existem quatro formas comuns e várias formas incomuns de melanoma (HARRIST et al. 2002).

O melanoma extensivo superficial é o mais frequente nas pessoas de pele clara (fototipo I a III). Seu diagnóstico é feito quando ocorre uma mudança brusca na

aparência de uma pinta que, ao longo dos anos, apresentou apenas pequenas variações. A lesão inicial é plana, com coloração bastante variada, dos tons de castanho, marrom, preto e vermelho às cores cinza, azul e branco, que correspondem às áreas de regressão. Mas, tardiamente, podem surgir nodulações negro-acinzentadas ou negro-azuladas sobre a “mancha” preexistente. Ele pode aparecer em qualquer local da pele, sendo mais comum na região da cabeça, pescoço e tronco, nos homens, e nos membros inferiores e extremidades nas mulheres (CHUDNOVSKY et al. 2005).

1.3.2 Melanoma em fase de crescimento vertical

Uma etapa fundamental na progressão do melanoma é a transição do tumor primário a partir da fase de crescimento radial (RGP - radial growth phase) para uma fase de crescimento vertical (VGP - vertical growth phase) (ROBERTSON et al. 1996).

Após um tempo variável (geralmente um a dois anos), a característica de crescimento da fase de crescimento radial muda focalmente. Os melanócitos exibem atividade mitótica focal e crescem como nódulos esferóides, de maneira semelhante a do crescimento de lesões metastáticas. Os nódulos expandem-se mais rapidamente do que o restante do tumor na derme papilar circundante. O direcionamento final do crescimento tende a ser perpendicular àquele da fase de crescimento radial, daí a expressão fase de crescimento vertical (HARRIST et al. 2002).

A medida da espessura de tumores em fase de crescimento vertical é feita a partir da camada mais externa do estrato granuloso até a parte mais profunda do

tumor (HARRIST et al. 2002). As características da fase de crescimento vertical são as seguintes:

- As células tendem a diferenciar-se em aspecto daquelas da fase de crescimento radial. Por exemplo, podem conter pouco ou nenhum pigmento, enquanto as células da fase de crescimento radial são melanóticas;
- O agregado celular que caracteriza a fase de crescimento vertical é maior do que os aglomerados de células que formam os componentes intraepidérmicos invasivos da fase de crescimento radial. O sítio dominante do crescimento do tumor é desviado da epiderme para a derme;
- Tumores que se estendem para a metade inferior da derme reticular estão, por definição, na fase de crescimento vertical;
- A resposta imunológica celular do hospedeiro pode estar ausente na fase de crescimento vertical.

Mesmo quando os tumores entram na fase de crescimento vertical, ainda podem faltar as propriedades necessárias para metástases. Alguns tumores têm pouca capacidade de dar metástases, enquanto outros têm maior potencial. Por exemplo, melanomas em fase de crescimento vertical, com menos de 1,0 mm de espessura, dificilmente apresentam mitoses evidentes, exibem um leve infiltrado de linfócitos e, raramente, dão metástases. Já melanomas em fase de crescimento vertical com mais de 3,6 mm de espessura, que exibem mais de seis mitoses/mm² e não contêm linfócitos infiltrando o tumor, geralmente darão origem à metástases (HARRIST et al. 2002).

1.3.3 Melanoma nodular

Embora, em geral, um câncer adquira suas propriedades de forma gradual, alguns tumores surgem com todas as suas características malignas expressas na lesão inicial (ERKURT et al. 2009). O melanoma maligno nodular é um exemplo desse tipo de tumor. Essa lesão, felizmente a forma mais rara de melanoma, surge como nódulo elevado e circunscrito, isto é, sobre a pele íntegra surge uma lesão nodular desde o início. Inicialmente, tende a ser esferoidal, ou seja, não se desenvolve através de uma fase de crescimento radial. Histologicamente, sua cor em tom enegrecido é uniforme, mas ele também pode ter coloração negro-azulada com veios acastanhados. No exame clínico, não se observa o componente da “mancha” ao redor do nódulo. O melanoma nodular compõe-se de um ou mais nódulos de células que crescem claramente de uma forma expansiva na derme. Em outras palavras, o tumor está na fase de crescimento vertical já quando observado inicialmente (HARRIST et al. 2002; ERKURT et al. 2009).

1.3.4 Melanoma lentigo maligno

O melanoma lentigo maligno, também conhecido como sarda de Hutchinson, é uma grande mácula pigmentada que ocorre na pele lesada pelo sol. Essa lesão desenvolve-se quase exclusivamente em pessoas brancas de pele clara, geralmente, idosos. Ocorre nas superfícies expostas do corpo e, de forma semelhante a outros tipos de melanoma, provavelmente relaciona-se com exposição à luz ultravioleta (HEDBLAD e MALLBRIS 2011). Na sua fase de crescimento radial, o lentigo maligno é uma placa achatada, irregular, de cor marrom a preta, que pode cobrir uma grande área da face ou o dorso das mãos. As células da fase de crescimento radial

encontram-se predominantemente na camada basal, formando, algumas vezes, pequenos ninhos que penetram a derme papilar. A invasão não é tão proeminente, nem tão extensa na fase de crescimento radial do melanoma lentigo maligno como é no melanoma extensivo superficial. As células da fase de crescimento radial, especialmente aquelas dispostas em ninhos, têm tamanho variável. A derme subjacente mostra um infiltrado linfocítico modesto e, quase invariavelmente, degeneração solar avançada do tecido conjuntivo (HARRIST et al. 2002).

Na fase de crescimento vertical, as células tendem a ser fusiformes. Ocasionalmente, as células desta fase provocam uma resposta de tecido conjuntivo, formando uma placa firme (melanoma desmoplásico). As células na fase de crescimento vertical também podem crescer ao longo de nervos pequenos (fase de crescimento vertical neurotrófica) (HARRIST et al. 2002).

1.3.5 Melanoma acral lentiginoso

O melanoma acral lentiginoso (ALM) é classicamente descrito como sendo mais comum em pessoas de pele escura. Trata-se de lesão agressiva, de crescimento insidioso pela dificuldade de visualização, pois se encontra essencialmente limitado às palmas, solas e regiões subungueais ((LANGLEY et al. 1998). Embora raro, ocorre um tumor semelhante nas membranas mucosas, denominado melanoma lentiginoso de mucosas (HARRIST et al. 2002; WEBER et al. 2007).

Na fase de crescimento radial, o melanoma acral lentiginoso forma uma área irregular de coloração marrom a preta, cobrindo uma grande parte da palma ou da sola, ou surge sob uma unha, geralmente, a do artelho maior ou a do polegar. Microscopicamente, as maiores das células encontram-se confinada à camada basal

da epiderme e mantém dendritos longos. Com frequência, há uma leve resposta linfocítica liquenóide. À medida que a fase de crescimento vertical se desenvolve, as células podem crescer para cima na epiderme e tornar-se mais epitelióides. A fase de crescimento vertical é semelhante àquela do melanoma lentigo maligno, consistindo comumente em células fusiformes. Caracterizado na sua fase *in situ*, por melanócitos anaplásicos, frequentemente dendríticos, muito pigmentados, intra-epidérmicos, dispostos em padrão lentiginoso ao longo da camada basal, se disseminando entre as várias camadas de queratinócitos. Ocasionalmente também se encontra neurotropismo (HARRIST et al. 2002).

Quando invasivo, não difere substancialmente dos melanomas de outros sítios anatômicos. O comportamento biológico parece depender, a exemplo de outros melanomas, de fatores como profundidade de infiltração, ulceração, mitoses, invasão de vasos sanguíneos e linfáticos ou comprometimento perineural, além da disseminação linfática ou sistêmica (PHAN et al. 2007).

1.3.6 Melanoma extensivo superficial

Melanomas novos, na fase de crescimento radial, apresentam uma borda levemente elevada e palpável. A neoplasia possui cor variável ao acaso. Algumas partes são incomumente pretas ou marrons escuras, enquanto sombras de cor marrom mais claro são mescladas com tonalidades cor-de-rosa ou azul mais claro. Ocasionalmente, a lesão toda é simplesmente marrom-escura (HARRIST et al. 2002).

O tipo extensivo superficial é o tipo mais comum (70% dos melanomas) e geralmente acomete tronco nos homens, e membros inferiores nas mulheres (CHUDNOVSKY et al. 2005). Há uma disposição característica das células na fase

de crescimento radial. Melanócitos epitelióides grandes estão dispersos em ninhos e como células individuais através de toda a espessura da epiderme, e nenhum ninho apresenta preferência de crescimento (tamanho maior) sobre as células circundantes. Esses melanócitos podem estar apenas na epiderme (melanoma *in situ*), mas a extensão focal para a derme papilar é a regra (MUTO 2007). Os melanócitos da fase de crescimento radial estão tipicamente associados a uma leve resposta linfocítica. Dessa forma, os melanócitos da fase de crescimento radial crescem em todas as direções: para cima na epiderme, perifericamente na epiderme e para baixo, a partir da epiderme para a derme. Não são observadas mitoses dérmicas. O aumento dessas lesões circulares dá-se na periferia; daí o termo fase de crescimento radial. É importante notar que o melanoma na fase de crescimento radial, apenas raramente, apresenta metástase. Exceto pelas lesões menores (< 6 mm de diâmetro), o melanoma superficial em disseminação pode ser diagnosticado na fase de crescimento radial com considerável precisão (HARRIST et al. 2002).

O melanoma adquire a capacidade de metastizar a partir da fase de crescimento vertical. Geralmente, as metástases iniciais envolvem os linfonodos regionais, embora seja comum também a disseminação através da corrente sanguínea. Quando ocorrem metástases pela corrente sanguínea, elas são incomumente disseminadas em comparação a outras neoplasias; praticamente todo sistema ou órgão pode ser envolvido (SVIDERSKAYA et al.2003).

Melanomas metastatizam por diferentes mecanismos, incluindo invasão direta dos tecidos vizinhos, se espalhando através do sistema linfático ou do sistema vascular. Apesar de sua relevância clínica, os mecanismos moleculares que orientam

a via de propagação e localização das metástases em tecidos diferentes não são bem conhecidos.

1.4 FATORES PROGNÓSTICOS

Os fatores prognósticos em melanoma são:

- Sexo (gênero): as mulheres apresentam um prognóstico melhor do que os homens. Por exemplo, mulheres com melanomas axiais com 0,8 a 1,7 mm de espessura apresentam uma taxa de sobrevida de quase 90 % dez anos após a excisão da lesão, enquanto, em homens, esta é de apenas 60% ((HARRIST et al. 2002; MERVIC 2012);
- Idade;
- Localização Anatômica do tumor primário: melanomas nas extremidades apresentam um prognóstico melhor do que aqueles na cabeça, pescoço ou tronco (axial). Entretanto, melanomas na sola do pé ou na região subungueal apresentam um prognóstico semelhante ou pior em comparação com lesões axiais;
- Espessura e ulceração do tumor;
- Nível de invasão e tipo histológico;
- Padrão de crescimento;
- Variantes desmoplástica ou neurotrópica;
- Contagem de mitoses: um forte indicador da proliferação do tumor e se evidencia como um fator prognóstico importante no melanoma (BARNHILL et al. 2005). O número de mitoses é um fator prognóstico independente até

oito anos após a remoção do melanoma primário e, exceto pela fase de crescimento do tumor primário, é a característica prognóstica mais poderosa. Os pacientes cujos tumores não mostram mitoses apresentam uma chance de sobrevida 12 vezes maior do que aqueles nos quais a taxa mitótica é superior a $6/\text{mm}^2$ (OLIVEIRA et al. 2011);

- Regressão: muitos melanomas primários mostram alguma evidência de regressão espontânea, indicada clinicamente por uma alteração para uma coloração azul-esbranquiçada ou branca. Microscopicamente, tal regressão caracteriza-se por derme papilar alargada, com melanófagos e infiltrado linfocítico. Os pacientes cujos tumores mostram essas alterações apresentam um prognóstico pior do que aqueles nos quais não há regressão;
- Pigmentação (FITZPATRICK et al. 1993);
- Infiltrado linfocítico: a interação de linfócitos e células tumorais na fase de crescimento vertical é um indicador prognóstico importante. A resposta celular é relatada como sendo infiltrativa quando os linfócitos realmente infiltram e rompem o tumor, frequentemente formando rosetas ao redor das células tumorais. Se houver linfócitos infiltrando o tumor na fase de crescimento vertical, ou estes forem vistos cruzando toda a base da fase de crescimento vertical, diz-se que o infiltrado é leve. O paciente cujo tumor exibe um infiltrado leve tem uma probabilidade de sobrevida 11 vezes maior do que a de pacientes cujo melanoma não possui linfócitos infiltrando o tumor;
- Volume Nuclear;

- Prognósticos Moleculares e de tratamento (CLARK et al. 1969; MORTON et al. 1993);
- Acometimento linfonodal: o melanoma cutâneo drena para o sistema linfático e seus níveis subsequentes. O linfonodo sentinela é o primeiro linfonodo a ser atingido pela metástase, se negativo, existe alta probabilidade de que os demais linfonodos não estejam acometidos (SOENGAS e LOWE 2003). Uma importante mudança nos estudos de melanoma foi a adoção do mapeamento linfático pela biópsia do linfonodo sentinela, que com grande acurácia e mínima morbidade indica o estadiamento dos linfonodos regionais à lesão (CLARK et al. 1969).

Os principais fatores prognósticos no melanoma estão relacionados a dados histopatológicos como avaliação da espessura (Breslow) e a invasão das camadas da pele de acordo com o nível de Clark (apenas para melanomas finos), com classificação de I a V (BRESLOW 1970; CLARK et al. 1969; BALCH et al. 2001).

O nível de invasão tumoral refere-se ao grau de penetração do tumor dentro das camadas anatômicas da pele. É um preditor da probabilidade de metástase, embora não seja tão preciso quanto a espessura do tumor. Apesar dos níveis de invasão não serem indicações prognósticas independentes de desfecho clínico, a invasão de nível IV pode predizer metástase para linfonodos e pode fornecer informação prognóstica adicional para tumores com mais de 1,0 mm (HARRIST et al. 2002).

Nível I As células tumorais situam-se completamente acima da membrana basal (*in situ*).

- Nível II Células invasivas presentes apenas na derme papilar (fase de crescimento radial).
- Nível III O tumor entrou na fase de crescimento vertical e compromete até a derme reticular, formando pequenos nódulos expansíveis que alargam a derme papilar.
- Nível IV As células tumorais claramente invadem a região entre os feixes de colágeno da derme reticular.
- Nível V O tumor estende-se para a gordura subcutânea (FARMER e HOOD 1990; EDER et al. 1997; BALCH et al. 1991).

A espessura do tumor medida em milímetros (índice de Breslow) é o fator mais importante na determinação do risco de recorrência e metástases, bem como é o principal determinante no manejo dos pacientes (GARBE et al. 2000; PHAN et al. 2007). Pode ser medida a partir da camada mais externa do estrato granuloso até uma penetração mais profunda do tumor na derme (BRESLOW 1970). Na prática, geralmente a espessura é registrada, e pode ser o único atributo utilizado para determinar o prognóstico. Nessa circunstância, o prognóstico pode ser previsto com certa precisão dividindo-se os tumores em quatro grupos de espessura, sem atenção à fase de crescimento do tumor (HARRIST et al. 2002).

Pacientes com lesões menores que 0,75mm de espessura histológica têm um bom prognóstico e poucos apresentam recorrência do tumor. Em lesões suspeitas de tamanhos pequenos e médios deve-se proceder exérese de toda a lesão com margem de segurança mínima (1 a 2 mm). Melanomas com Breslow acima de 4,0 mm têm alto risco de recorrência local (10 a 20%), mesmo seguindo-se este padrão nas ressecções (BARNHILL et al. 2005).

A identificação dos pacientes com metástase linfática oculta é importante no manejo da doença. Para o Grupo Brasileiro de Melanoma (GBM), as indicações para a pesquisa do LS devem ser realizadas nas seguintes condições: Breslow $\geq 0,76\text{mm}$, Breslow $< 0,76\text{mm}$ só nos casos que estejam associados à ulceração, regressões histológicas, ou Clark IV/V (EMMERT-BUCK et al. 1996). Esta técnica permite a identificação de metástases ganglionares assintomáticas, não acessíveis por exames de imagem, reservando o esvaziamento ganglionar regional aos pacientes que comprovadamente apresentarem disseminação da doença, reduzindo a morbidade relacionada a este procedimento (BARNHILL et al. 2005; Hospital A.C. Camargo 2011).

Ulceração é definida como solução de continuidade da epiderme, substituída por tampão fibrino-leucocitário sobre a lesão primária, em decorrência da infiltração neoplásica (SÁ 2005). A ulceração é o segundo fator prognóstico de maior importância nos melanomas localizados (estádios I e II) (SÁ 2005). Nos melanomas em estágio III, é a característica histológica de pior prognóstico do tumor primário (SÁ 2005). Nos melanomas com espessura acima de 1 mm é considerada o fator preditivo mais significativo, representando maior risco de desenvolvimento de metástases (SÁ 2005). A presença de ulceração define os subgrupos da categoria T (tumor) de acordo com o novo estadiamento determinado pelo *American Joint Committee on Cancer* (BALCH CM et al. 2001b).

1.5 EXPRESSÃO GÊNICA EM MELANOMAS CUTÂNEOS – TÉCNICAS PARA ESTUDO

O termo expressão gênica refere-se ao processo em que a informação codificada por um determinado gene é decodificada em um RNA mensageiro. Teoricamente, a regulação em qualquer uma das etapas desse processo pode levar a uma expressão gênica diferencial. Em organismos multicelulares, a expressão gênica controlada regula um programa genético fundamental para o desenvolvimento embrionário e a diferenciação. Dentre as técnicas para análise de expressão gênica incluem PCR (polymerase chain reaction), *differential display*, *Northern blot*, entre outros, entretanto uma das limitações destas metodologias se baseia no pequeno número de genes que pode ser estudado em um único experimento (GOTO et al. 2006)

Nos últimos anos, ficou claro que o estudo da expressão gênica de determinados grupos de células podia ser contaminado pelo seu microambiente. Com a finalidade de reduzir a possibilidade de contaminação, foram desenvolvidos vários sistemas de dissecação tecidual utilizando raios laser para isolar grupos de células de interesse. A técnica de microdissecação a laser desenvolvida em 1996 por pesquisadores do *National Cancer Institute* (NCI) dos EUA (EMMERT-BUCK et al. 1996) tornou-se uma ferramenta extremamente importante na pesquisa biológica, potencialmente ampliando o uso de técnicas já existentes de Biologia Molecular. Com esta técnica é possível a obtenção de pequeno número de células tumorais, reduzindo a possibilidade de contaminação por células estromais, de material celular homogêneo de tecidos ou de preparados citológicos heterogêneos. O material extraído pode ser previamente fixado em parafina (material de arquivo) ou congelado.

Grupos de células semelhantes, estruturas multicelulares, ou mesmo, células únicas e cromossomos podem ser isolados. Mas esta técnica ainda mantém a limitação no número de amostras a serem estudadas (EMMERT-BUCK et al. 1996).

Buscando a identificação dos alvos moleculares da ação do MEL (Melfalano) e do TNF (*Tumor Necrosis Factor*) no melanoma, um estudo foi conduzido nesta instituição no qual foi determinado o perfil de expressão gênica do melanoma cutâneo em resposta ao tratamento com as referidas drogas isoladamente ou em combinação em modelo murino (LIMA 2007). Foi identificado, empregando-se a técnica de oligonucleotide microarray, um conjunto de genes cuja expressão foi modulada no melanoma, após 3 horas de tratamento com MEL, TNF e MEL+TNF, num modelo tumoral in vivo murino. A administração de MEL promoveu uma menor velocidade de crescimento tumoral e isso não foi modificado pela coadministração de TNF (LIMA 2007). Entretanto, tumores tratados com TNF apenas ou em combinação com MEL apresentaram mais necrose e menos mitoses. Um número menor de mitoses também foi observado em resposta a MEL (LIMA 2007). O tratamento com MEL ou MEL+TNF esteve associado com aumento da sobrevida livre de progressão. Dentre os genes cuja expressão foi modulada pelos tratamentos estão *Fabp4* (FABP4), *Flt1* (VEGFR1), *Ifi202b* (IFI16), *Tfe3* (TFE3) e *Igf2bp3* (IMP3).

O tratamento com MEL+TNF modulou positivamente a expressão dos genes *Ifi202b* e *Igf2bp3*. *Flt-1* foi modulado negativamente nos tumores de animais tratados com TNF combinado ou não a MEL (LIMA 2007).

Fabp4 apresentou grande variação de expressão. Nos grupos tratados com TNF (TNF e TNF+MEL) foi regulado negativamente e, no grupo do MEL,

positivamente, sendo que em todos os grupos foi observada uma razão de expressão $\geq 2,0$. Embora sem atingir significância estatística no microarray, os dados de qRT-PCR mostraram diferença de expressão estatisticamente significantes em relação ao controle (LIMA 2007).

Desta maneira, acreditamos que tais genes e seus produtos poderiam representar marcadores de resposta à quimioterapia, e eventualmente de resposta à terapia biológica.

1.6 VEGFR1

A angiogênese é um processo fisiológico definido como a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, e desempenha um papel importante tanto em condições fisiológicas normais, como patológicas (BERGERS e BENJAMIN 2003; HICKLIN e ELLIS 2005).

Esse processo ocorre durante a formação de novos tecidos, quando são requeridos oxigênio e nutrientes para o crescimento das células e depende de substâncias que o estimule, como os fatores de crescimento vascular endotelial. O VEGF (vascular endothelial growth factor) é expresso por uma variedade de células, incluindo o músculo liso, células endoteliais, epiteliais, monócitos, macrófagos, linfócitos T e neutrófilos (MENENDEZ et al. 2006; FRANK et al. 2011).

A família de VEGF é composta por seis glicoproteínas estruturalmente relacionadas. As moléculas são VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE e o fator de crescimento placentário PlGF (*Placenta growth factor*) 1, 2 e 3 (KERBER et al. 2008).

A regulação da angiogênese depende do equilíbrio entre indutores e inibidores deste processo, interagindo através de receptores específicos nas células-alvo (KERBER et al. 2008).

A superexpressão de VEGF frequentemente tem sido associada com mau prognóstico e com progressão tumoral em vários tumores, incluindo melanomas, aumentando a probabilidade de metástases e diminuindo a ocorrência de apoptose espontânea (HICKLIN e ELLIS 2005; MENENDEZ et al. 2006; KERBER et al. 2008).

O VEGF é um dímero proteico, formado pela interação de duas proteínas. É um sinalizador com ação autócrina e parácrina, que ativa receptores transmembranares, principalmente em células endoteliais. Sua molécula liga-se a receptores das células endoteliais (VEGFR) para estimular o crescimento e a sobrevivência celular. É uma etapa essencial no desenvolvimento tecidual pré e pós-natal e também participa da cicatrização, reprodução, doenças inflamatórias e degenerativas, distúrbios metabólicos e mobilização das células progenitoras endoteliais (EPCs) da medula óssea para a circulação periférica (SMYTH et al. 1996; HICKLIN e ELLIS 2005).

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e seus dois receptores (VEGFR), tirosina-quinase Fms-like 1 ou Flt-1 (VEGFR1) e KDR/Flk-1 (VEGFR2), têm demonstrado ser um sistema de regulação essencial para formação de vasos sanguíneos em mamíferos (HIRASHIMA et al. 2003).

VEGFR2 é um transdutor de sinal importante e positivo para angiogênese através da sua forte atividade tirosina-quinase (TK). VEGFR1 tem uma afinidade bioquímica para o VEGF que é pelo menos 10 vezes maior do que a de VEGFR2,

mas sua atividade TK é muito fraca, 10 vezes menor do que a de VEGFR2, e não induz atividades biológicas em condições normais, tais como proliferação ou migração de células endoteliais, sugerindo uma função diferente da VEGFR2. O VEGFR1 e o VEGFR2 são especificamente expressos em células endoteliais vasculares, e como uma exceção, o mRNA de *flt-1* foi mostrado ser expresso em monócitos / macrófagos (HIRASHIMA et al. 2003).

Recentemente, muitos estudos têm demonstrado que VEGFR1 tem uma ação negativa de regulação da angiogênese fisiológica do embrião (HIRASHIMA et al. 2003; HIRATSUKA et al. 2001). No entanto, ainda é discutível se a TK de VEGFR1 tem papel positivo na angiogênese em estádios adultos. Resultados indicam que VEGFR1 é um regulador positivo, usando a sua tirosina-quinase sob condições patológicas em que o ligante específico de VEGFR1, PlGF, é anormalmente expresso (HIRATSUKA et al. 2001). Elevações de PlGF em carcinomas de células renais, bem como alguns tumores cerebrais, e o aumento do mRNA do VEGFB em pacientes com melanoma sugerem que não apenas VEGFR2, mas também VEGFR1 estão envolvidos durante a angiogênese em tumores de uma maneira geral (HIRATSUKA et al. 2001; MILLAUER 1993).

Portanto, além do bloqueio do VEGF e do VEGFR2, a supressão do eixo VEGFR1/PlGF/VEGFB pode ser necessária para diminuir certos tipos de angiogênese patológica in vivo. Isso porque o VEGFR1 pode-se ligar ao VEGF, PlGF e ao VEGFB com afinidades diferentes. Assim, VEGFR1 tem uma dupla função na angiogênese, atuando de maneira positiva ou negativa em diferentes condições biológicas (HIRATSUKA et al. 2001; MILLAUER 1993).

Evidências indicam que Flt1 induz a expressão da metaloproteinase de matriz 9 (MMP9), envolvida no desenvolvimento de metástases pulmonares e na angiogênese patológica em tumores (MENENDEZ et al. 2006; SINGH et al. 2006).

STRAUME et al. (2001) demonstraram uma associação entre a expressão de FLT1 e de VEGF em amostras de melanoma em crescimento vertical. Observaram também a correlação positiva entre FLT1 e p16 nuclear (proteína com atividade supressora sobre ciclina D e, portanto, capaz de regular a progressão do ciclo celular). A presença de proliferações microvasculares glomerulóides (GMPs), brotamentos proliferativos focais de células endoteliais que lembram um glomérulo renal, está associado com um pior prognóstico em melanomas. Foi visto também uma associação positiva entre a expressão de VEGFA, KDR, FLT1 e neuropilina-1 e a formação de GMPs em melanomas em fase de crescimento vertical (STRAUME e AKSLEN 2001).

1.7 FABP4

Fabp4 codifica a proteína aP2 (Fabp4), uma pequena molécula de 15 KDa que faz parte da família de LBPs (lipid-binding proteins), mais especificamente das FABPs (fat acid binding proteins - proteínas que se ligam a ácidos graxos de cadeia longa) (LIU et al. 2008), como os ácidos graxos de cadeia longa, os eicosanóides, leucotrienos e prostaglandinas.

Atualmente existem 9 FABPs identificadas em mamíferos, sendo expressas numa variedade de tecidos. Particularmente, FABP4 é expressa principalmente no

tecido adiposo, mas estudos recentes sugerem que pode ser mais amplamente expressa (BIRON-SHENTAL et al. 2007; LIU et al. 2008).

A expressão diminuída de FABP4 se correlacionou com estádios mais avançados e grau histológico elevado em tumores de bexiga (BOITEUX et al. 2009).

VEGF induz FABP4 via VEGFR2 e não VEGFR1 e o tratamento com os agonistas de VEGFR1, PlGF1 e PlGF2, não aumenta a expressão FABP4, enquanto que a inibição química de VEGFR2 quase inibiu completamente a indução de FABP4 pelo VEGF (ELMASRI et al. 2009). É sabido que as atividades angiogênicas de VEGF, incluindo proliferação, sobrevivência, migração e permeabilidade, são transduzidas principalmente através VEGFR2. Assim, pode-se sugerir que FABP4 tenha papel na atividade angiogênica mediada pela via VEGF/VEGFR2. No entanto, estudos *in vivo* são necessários para determinar se FABP4 promove a sobrevivência ou a proliferação de células endoteliais de microvasos em condições patológicas caracterizadas por ativação da via VEGF/VEGFR2, como isquemia, hipóxia, ou desenvolvimento do tumor (ELMASRI et al. 2009).

Fabp4 (aP2) pode regular a expressão gênica ativando várias classes de receptores nucleares, sendo PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) o melhor caracterizado. PPARG está envolvido em processos como diferenciação adipocitária, modulação da sensibilidade à insulina e função de macrófagos. Também inibe a proliferação celular, inclusive induzindo apoptose em algumas linhagens de carcinomas (AYERS et al. 2007). Dessa forma, a modulação da expressão de FABP4 teria um efeito direto sobre a atividade de PPARG, aumentando ou diminuindo a atividade do mesmo.

1.8 PPARG

O receptor nuclear PPAR (peroxisome proliferator and activator receptor) é de fundamental importância para a homeostase energética, já que os PPARs regulam diversos aspectos do metabolismo energético ao nível da transcrição (BENSINGER e TONTONZOZ 2008; WANG 2010). São reconhecidos vários ligantes endógenos de PPAR como ácidos graxos, derivados de ácido linoléico, eicosanóides, e componentes oxidados de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL) (WANG 2010). O comprometimento funcional ou desregulação destes receptores leva a uma variedade de doenças metabólicas (JEMAL et al. 2005).

Os estudos destes receptores têm avançado nosso conhecimento do metabolismo energético e nos ajudou a compreender os mecanismos patogênicos da síndrome metabólica. A subfamília de receptores nucleares PPAR é composta por três proteínas: PPARG, PPARG (ou PPARG) e PPARG, também conhecidas como NR1C1, NR1C2 e NR1C3, respectivamente (PETERS et al. 2012).

Os três PPARs têm diferentes distribuições nos tecidos, mas se sobrepõem funcionalmente. No entanto, é evidente que as atividades ou níveis de expressão de PPARs estão sujeitos à modulação por dieta, estado nutricional e estado metabólico.

Através de suas funções distintas, mas sobrepostas, e distribuição nos tecidos, os três PPARs atuam como sensores de ácidos graxos para controlar vários programas metabólicos que são essenciais para a homeostase energética sistêmica. Não surpreendentemente, eles têm implicações importantes para doenças metabólicas em seres humanos.

PPARG é um regulador mestre do tecido adiposo e da adipogênese e é essencial para a homeostase da energia do corpo inteiro (BENSINGER e TONTONNOZ 2008). Outra função importante do PPARG é a inibição de processos inflamatórios ao nível de expressão gênica (WANG 2010).

Agonistas de PPARG demonstraram previamente um efeito antiproliferativo em células de melanoma maligno com eficácia superior a outros agentes (FREUDLSPERGER et al. 2010). Vários grupos demonstraram que agonistas de PPARG inibem proliferação celular, induzem parada de crescimento celular e apoptose, diminuem a densidade vascular e reduzem o potencial metastático em modelos de melanoma e câncer de pulmão de células não-pequenas (PANIGRAHY et al. 2005; BOTTON et al. 2009).

1.9 IMP3

Ao longo dos últimos anos, IMP3 foi identificado como um importante biomarcador de prognóstico capaz de identificar pacientes com um alto potencial para desenvolver metástase (SITNIKOVA et al. 2008; OZDEMIR et al. 2011; JIANG et al. 2006). IMP3, um membro da família IMP, formada por IMP1, IMP2 e IMP3 (LIAO et al. 2005; YUAN et al. 2009; HAQ e FISHER 2011), caracteriza-se por apresentar 6 domínios de ligação ao RNA, sendo dois domínios de reconhecimento de motivos e quatro domínios de homologia à ribonucleoproteína heterogênea nuclear K (LIAO et al. 2005).

O gene *Igf2bp3* em camundongos codifica a proteína Imp3 (Insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein 3) que se liga à região 5' não traduzida do

mRNA de IGF2 (Insulin-like growth factor 2) e regula a expressão do referido gene (*Igf2*), este último é um dos principais ligantes do receptor de *Igf1* e estimula sua fosforilação nos resíduos de tirosina, transduzindo sinais mitogênicos dentro da célula que poderiam estar envolvidos com a tumorigênese (LI et al. 2008). O gene *IMP3* está localizado no cromossomo 7p11.2, em humanos, e é expresso principalmente durante o desenvolvimento de epitélios, músculos e placenta nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário humano, mas é expresso em concentrações baixas ou indetectáveis em tecidos adultos e, em alguns tumores (SITNIKOVA et al. 2008; JIANG et al. 2008). Assim, *IMP3* é considerada uma proteína oncofetal que, quando superexpressa, pode desempenhar um papel fundamental na regulação, proliferação e invasão da célula cancerosa por estar geralmente associados com tumores agressivos e avançados (LI et al. 2008; ZHENG et al. 2008).

A metástase à distância é a principal causa de morte por câncer e o potencial metastático dos tumores é bastante imprevisível. *IMP3* foi relatado como tendo valor prognóstico para o carcinoma da bexiga e o carcinoma de células renais (LI et al. 2008; HOFFMANN et al. 2008).

Comparada com a de carcinomas de células renais não metastáticos, a expressão de *IMP3* foi encontrada aumentada, consideravelmente, não só em tumores metastáticos, mas também em um subgrupo de tumores primários que podem ser susceptíveis ao posterior desenvolvimento de metástases. Pacientes com tumores primários localizados que não expressavam *IMP3* tiveram uma sobrevida livre de metástases maior do que aqueles com tumores que expressavam *IMP3* (LI et al. 2008).

A detecção de IMP3 apenas em carcinomas uroteliais invasivos, embora alguns deles fossem de baixo grau, mostrou que a expressão de IMP3 pode estar relacionada ao comportamento agressivo destes (JIANG et al. 2008; HOFFMANN et al. 2008).

A hipótese de que IMP3 é expresso no melanoma maligno, mas não em nevos, e de que ele é um biomarcador de progressão no melanoma maligno foi testada em um estudo realizado por PRYOR et al. (2008). Neste estudo, lesões melanocíticas, incluindo nevos benignos, nevos displásicos, nevos de Spitz e melanomas malignos, foram analisados quanto à expressão de IMP3. IMP3 não foi detectada em nevos benignos nem em nevos displásicos. Os nevos de Spitz, ocasionalmente, expressaram IMP3, mas a intensidade da imunexpressão foi muito fraca. Em contrapartida, a maioria dos melanomas malignos expressou IMP3 e a intensidade da imunexpressão foi de moderada a forte. Estes resultados indicam que IMP3 pode ter um valor de diagnóstico ao segregar os nevos de melanoma maligno (PRYOR et al. 2008; MENTRIKOSKI et al. 2009).

1.10 IFI202 (IFI16)

Os interferons (IFNs) são citocinas com atividade antiviral, antibacteriana, antiprotozoário, imunomoduladora e com função de promover crescimento e regulação celular. Exercem estas funções através do controle da expressão de vários genes que codificam proteínas efetoras. Uma delas é a P202, uma proteína nuclear que é codificada pelo gene IFI202 (MIN et al. 1996).

A proteína P202 (52 kDa) é um modulador de transcrição induzível que pertence à família da proteína p200 das IFN-inducible-proteins (p202a, p202b, p203, p204 e D3).

A capacidade da P202 para modular a transcrição dos genes depende da sua capacidade de se ligar e inibir a atividade transcricional de fatores tais como E2Fs, NFkB, c-Myc e AP-1 (XIN et al. 2006).

A expressão aumentada da proteína p202 (codificada pelo gene *Ifi202*) foi correlacionada com defeitos na apoptose (inibição), diminuindo a proliferação de células T e desempenhando, assim, um papel direto na proliferação ou sobrevivência de células T (MIN et al. 1996; CHENA et al. 2008; ZIMMERMAN et al. 2010).

Num modelo de células L929 transfectadas com pcDNA para expressão de p202 e tratadas com IFNB, observou-se que essa proteína inicialmente aparece no citoplasma, onde se acopla à componentes subcelulares de sedimentação rápida e então se acumula no núcleo (na metáfase, p202 parece associar-se à cromatina nuclear). Algumas proteínas podem se ligar a p202 *in vitro* e *in vivo*, como pRB (retinoblastoma susceptibility protein) que tem papel central no controle do ciclo celular. Sabe-se que a expressão aumentada de p202 em células transfectadas diminui a velocidade de proliferação, inibindo a expressão gênica através de sua atividade sobre os fatores de transcrição NFkB, FOS e JUN. Uma das atividades de NFkB seria o controle da expressão de genes da resposta inflamatória e imune (inclusive INF) (MIN et al. 1996).

O IFI16 é o equivalente humano da P202 (*Ifi202*) em camundongos. Presumivelmente, IFI16 regula a atividade de certos fatores de transcrição nucleares que estão envolvidos com controle de morte celular. Estudos recentes têm

demonstrado que IFI16 é detectado em núcleos de linfócitos no baço, timo, linfonodos, e tonsilas palatinas, mas também é encontrada em células epiteliais nestes tecidos. A proteína IFI16 também é expressa em tecidos não-linfóides, incluindo a traquéia, trato gastrointestinal, pele e testículos. Dada a expressão de IFI16 em células epiteliais, é provável que IFI16 possa ser importante para algumas funções específicas de células epiteliais (FUJIUCHI et al. 2004; KIM et al. 2008).

Em relação ao comportamento do melanoma, as proteínas descritas anteriormente podem ser de grande importância para caracterização dos efeitos biológicos, pelo papel fundamental que exercem em várias etapas da tumorigênese como proliferação, adesão, migração, apoptose e angiogênese, além de poderem estar associados à resposta terapêutica a tratamentos sistêmicos (imunoterapia) ou locais (perfusão isolada de membros) (CHOUBEY et al. 2000).

Até o presente, várias estratégias terapêuticas são aplicadas no combate ao câncer, algumas promovendo melhora na saúde dos pacientes acometidos, todavia para o melanoma pouco avanço tem sido obtido. A identificação de alvos moleculares para novas drogas e o papel de agentes anti-angiogênicos têm sido tema de pesquisas recentes. Dessa maneira, acreditamos que a melhor compreensão dos eventos celulares e moleculares subjacentes à ação das drogas citadas acima pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes e menos tóxicos para essa neoplasia de tratamento com resultados ainda tão frustrantes (CHOUBEY et al. 2000).

1.11 TFE3

A família dos tumores MiTF é representada por um grupo de neoplasias determinadas geneticamente por alterações dos fatores de transcrição microftalmia (TFEB, TFE3, TFEC e MiTF - fatores de transcrição homólogos) (GODING 2000; HAQ e FISHER 2011). São reguladores fisiológicos do crescimento celular, diferenciação e sobrevivência em diversos tipos de tecidos (LEVY et al. 2006; HAQ e FISHER 2011). Isso porque sua desregulação pode levar a neoplasia melanocítica associada a TFE3 (Transcription factor E3), a melanomas malignos cutâneos, carcinoma de células renais associados a translocação Xp11 e t(6;11) e alguns sarcomas alveolares de partes moles e células claras.

A neoplasia melanocítica associada à TFE é uma neoplasia maligna epitelióide renal muito rara que mostra fusão do TFE3 e produz melanina. Os casos iniciais ocorreram em crianças e apresentaram-se muito agressivos com doença metastática disseminada. A neoplasia é positiva para Melan-A e HMB-45 e negativa para CKs, marcadores de túbulos renais e musculares. Fusões do TFE3 confirmadas por imunoistoquímica onde a coloração deve ser nuclear, limpa e visível em menor aumento, cujo, controle interno negativo é muito importante, e técnicas moleculares (PSF-TFE3) (CHANG et al. 2009).

São neoplasias de difícil classificação com características que se sobrepõem com carcinoma de células claras renais com translocação Xp11 e melanoma. A negatividade para CD10, PAX2 e PAX8 diferenciam esses tumores dos clássicos Xp11. A neoplasia é negativa para MiTF ao contrário dos melanomas (ARGANI et al. 2009).

Esses fatores são capazes de regular a melanogênese celular e de ativar a expressão de HMB-45 e Melan-A. Essa família de tumores tende a mostrar graus variados e sobrepostos de diferenciação epitelial e melanocítica (STEINGRIMSSON et al. 2002).

1.12 TISSUE MICROARRAYS (TMAS)

O arranjo em matriz de amostras teciduais, ou Tissue microarrays (TMAs), é uma técnica descrita em KONONEN et al. (1998), que permite a avaliação dos produtos gênicos (GOULD ROTHBERG et al. 2009), bem como sua localização, paralelamente num grande número de amostras. Tem sido utilizada em lesões melanocíticas, permitindo a análise global dos genes expressos em diferentes tipos de abordagens (CHOUBEY et al. 2000; REZZE 2008; SÁ 2005).

São aquisições recentes em Anatomia Patológica, na qual, a essência do procedimento é o estudo histopatológico detalhado, demarcando pequenas amostras que representem cada variável morfológica a estudar, seguindo-se sua extração do bloco correspondente (blocos doadores) com o uso de uma agulha, dando origem a pequenos cilindros de tecido fixados em formalina que serão distribuídos em blocos de parafina convencionais em posição perfeitamente orientada no bloco receptor (a depender do calibre da agulha utilizada, o bloco poderá conter dezenas ou até centenas de cilindros) (KONONEN et al. 1998; KIM et al. 2002). Deste modo, pequenas amostras representativas de regiões específicas, bem caracterizadas morfológicamente de tecidos de múltiplos pacientes podem ser submetidas a estudos moleculares simultaneamente (RUBIN 2001; KORABIOWSKA et al. 2004). Isso

possibilita a criação de bancos compreendendo melanomas primários em diferentes estádios e suas possíveis metástases, em localizações diversas, permitindo o estudo de diversas proteínas para a determinação de possíveis marcadores biológicos de prognóstico e resposta terapêutica (RUBIN 2001; KORABIOWSKA et al. 2004).

2 JUSTIFICATIVA

O melanoma cutâneo embora uma neoplasia pouco prevalente, vem apresentando incidência crescente, e apresenta alta mortalidade quando não diagnosticado em estágio precoce.

É uma neoplasia extremamente complexa e que apresenta múltiplas interações com o hospedeiro em nível sistêmico e em seu próprio microambiente.

Previamente observamos a modulação de alguns genes, em um modelo murino, em resposta a tratamento com melfalano e TNF, genes estes envolvidos em processos como modulação de resposta imune inata e adaptativa, proliferação celular, angiogênese e metabolismo lipídico, alguns inclusive para os quais existem terapias em desenvolvimento (inibidores de PAK1, inibidores de tirosina-quinase do VEGFR1, inibidores de FABP e agonistas de PPAR).

Desta forma, acreditamos que a caracterização da frequência de imunoexpressão destas proteínas em amostras de melanoma e sua correlação com características clínicas e patológicas podem ser de considerável relevância para melhor compreensão da biologia do tumor e para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para esta neoplasia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Correlacionar a imunoexpressão para VEGFR1, PPARG, FABP4, IMP3, TFE3 e IFI16 com dados clínicos e patológicos em melanomas cutâneos extensivos superficiais e lentiginosos acrais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas VEGFR1, PPARG, FABP4, IMP3, TFE3 e IFI16 em melanomas cutâneos extensivos superficiais e lentiginosos acrais.

Avaliar a associação dos marcadores citados acima entre si.

Quantificar o impacto da imunoexpressão VEGFR1, PPARG, FABP4, IMP3, TFE3 e IFI16 na sobrevida global e livre de progressão dos pacientes.

Calcular a sobrevida global e livre de progressão em função dos dados clínico-patológicos e da expressão dos marcadores supracitados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se do estudo de duas coortes retrospectivas, nas quais foram selecionados pacientes diagnosticados, e tratados, no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A.C. Camargo com melanoma cutâneo do tipo extensivo superficial e melanoma lentiginoso acral.

Projeto de Pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição sob o número 1570/11.

Foram realizadas avaliação e revisão dos prontuários dos pacientes para análise de variáveis demográficas, dados clínicos, estadiamento, tratamento, evolução e status conforme protocolo estabelecido pelo Grupo Brasileiro de Melanoma. Estes dados foram registrados em fichas de coleta de dados (Anexo 1 e 2) e, posteriormente, transferidos para uma planilha de Excel. Para este estudo especificamente, as duas planilhas foram uniformizadas para permitir a análise conjunta dos dois grupos.

4.1.1 Critérios de Inclusão

- 1 Pacientes com diagnóstico de melanoma extensivo superficial e de melanoma lentiginoso acral.
- 2 Diagnóstico realizado no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer, cujos blocos de parafina estiveram disponíveis nos arquivos do

Departamento de Anatomia Patológica, com material suficiente para confecção do tissue microarray.

- 3 Pacientes com metástases foram incluídos quando os blocos de parafina estavam disponíveis nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica e dispunham de material suficiente para confecção do tissue microarray.
- 4 Pelo menos 2 anos de seguimento clínico, a partir do diagnóstico histopatológico de melanoma cutâneo do tipo extensivo superficial e do tipo lentiginoso acral, para que ao final do estudo existisse 6 anos ou mais de acompanhamento.

4.1.2 Critérios de Exclusão

- 1 Ausência de material biológico disponível nos blocos de parafina.
2. Tratamento realizado fora do Hospital A. C. Camargo.

4.2 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Originalmente, foram coletados dados como:

Dados do paciente: data de nascimento, idade ao diagnóstico, sexo, raça, naturalidade, nacionalidade;

Fatores de risco: casos de melanoma maligno na família, grau de parentesco, fototipo de pele, nevo melanocítico atípico, nevo congênito, nevo melanocítico múltiplo, história de queimadura solar, melanoma relacionado à gravidez;

Dados do tumor (clínica): data do diagnóstico no hospital, tumor metacrônico, tamanho da lesão primária, localização da lesão primária (cabeça e pescoço, tronco, MMSS (membros superiores), MMII (membros inferiores), mãos ou pés);

Histopatologia da lesão primária: tipo histológico (melanoma acral lentiginoso invasivo, melanoma acral-lentiginoso in situ), tipo de crescimento (vertical ou radial), índice mitótico, Breslow (mm), Clark, presença de ulceração, presença de regressão;

Estadiamento locorregional: pesquisa de linfonodo sentinela (LNS), número do anatomopatológico do LNS, data da cirurgia, base linfonodal encontrada (axilar, inguinal, cervical, poplítea, outras) e resultado do exame histopatológico (LNS positivo/LNS encontrado, macro ou micro);

Metástases: presença de doença metastática, local (pele, linfonodo, víscera); Estadiamento AJCC 2001: tumor, nódulo, metástase, estadiamento final;

Evolução da doença: primeira alteração de estágio, data da primeira alteração de estágio e novo estágio, segunda alteração de estágio, data da segunda alteração de estágio e novo estágio, data da última notícia, status do paciente (vivo com doença, vivo sem doença, morte por câncer, morte por outras causas).

Entretanto, nem todos os dados coletados nos levantamentos iniciais foram analisados neste estudo em particular, já que a associação de algumas variáveis com a expressão ou não dos marcadores ora estudados não seria justificada (AGUIAR et al. 2009).

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Verificou-se a disponibilidade dos preparados histológicos e blocos de parafina no Departamento de Anatomia Patológica para a revisão histopatológica dos casos, para confirmação diagnóstica e avaliação das variáveis anatomopatológicas, estabelecendo-se os parâmetros prognósticos de acordo com protocolo estabelecido pela Sociedade Brasileira de Patologia e pelo Grupo Brasileiro de Melanoma.

Dos dados anatomopatológicos foram utilizados os seguintes parâmetros:

- 1 Tipo histológico (melanoma lentiginosos acral invasivo, melanoma lentiginoso acral *in situ* e melanoma cutâneo do tipo extensivo superficial);
- 2 Tipo de crescimento (radial ou vertical);
- 3 Espessura de Breslow (mm) para determina o volume da neoplasia e correlaciona-se diretamente com a profundidade de infiltração do tumor;
- 4 Nível de Clark;
- 5 Índice mitótico que é expresso como o número de mitoses em 10 campos de grande aumento (400X) na área invasiva do tumor;
- 6 Presença de ulceração;
- 7 Presença de regressão histológica.

4.4 CONFECÇÃO DOS TISSUE MICROARRAYS – TMAS

Para a confecção do tissue microarray (TMA) com amostras de melanoma extensivo superficial foi utilizada o tissue microarrayer (Beecher Instrunents ®, Silver Spring, EUA), aparelhagem disponível no Departamento de Anatomia

Patológica do Hospital A.C. Camargo. A área identificada no bloco doador foi puncionada em 2 locais diferentes (selecionados previamente) com agulha de 1,0mm e os cilindros obtidos foram transferidos para um bloco de parafina receptor. Foram incluídas 111 amostras em duplicata, totalizando 222 amostras no TMA. As 111 amostras incluíram 72 tumores primários (melanomas extensivos superficiais acima de 1,0 mm), 29 tumores metastáticos (13 metástases cutâneas, 8 linfonodais e 8 pulmonares) e 10 nevos compostos. Todas as metástases cutâneas e linfonodais e um caso de metástase pulmonar têm melanoma primário incluído no TMA. As sete amostras restantes foram incluídas para possibilitar a análise comparativa de expressão das proteínas estudadas entre os diferentes grupos de tumor metastático. Confeccionou-se 100 lâminas a partir do bloco receptor, em cortes sequenciais de 6 µm. As lâminas 01, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 foram coradas com hematoxilina e eosina para controle do material incluído. Através de mapa construído em planilha Excel®, com identificação detalhada de cada cilindro, é possível a localização precisa de cada caso no bloco e lâminas do TMA (BUBENDORF et al. 2001; KIELHORN et al. 2003; ALONSO et al. 2004; SÁ 2005).

Para o TMA contendo as amostras de melanoma acral, a partir do corte original corado em hematoxilina e eosina, as áreas neoplásicas após marcação com caneta, serviram de guia para identificação da área equivalente a ser puncionada no bloco doador. O cilindro de tecido retirado do bloco doador foi transferido para o bloco receptor através do uso do equipamento disponível no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer: tissue microarrayer (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA). O bloco de TMA foi confeccionado com cilindros de 1,0mm de diâmetro a partir de 53 amostras de melanomas acrais

representados em duplicata. Utilizou-se um cilindro de tecido hepático para orientação inicial de cada sequência dos casos utilizados (SHEN et al. 2003; CALY 2010).

A construção destes TMAs e a coleta de dados dos pacientes incluídos nos mesmos já foram avaliados, previamente, pelo Comitê de ética em Pesquisa desta instituição e os respectivos processos aprovados sob os números 465/03 e 879/07.

4.5 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Os blocos de TMA foram cortados no micrótomo rotativo na espessura de 5,0 µm. O corte obtido é afixado a uma fita adesiva apropriada e, posteriormente, esta fita é colada sobre uma lâmina de vidro adequada para imunoistoquímica. Um rolo é passado manualmente sobre a fita para assegurar a retirada de qualquer bolha que tenha se formado.

A lâmina com a fita foi irradiada com UV por 30 minutos, sendo em seguida mergulhada em solução solvente (TPC) e seca a temperatura ambiente. As fitas são retiradas após a secagem. A lâmina sofre banho de parafina, estando pronta para o armazenamento em freezer.

Para desparafinização, as lâminas foram inicialmente deixadas por 24 horas em estufa à 60°C e depois submetidas sequencialmente às seguintes etapas:

- Xilol a 60°C por 20 minutos;
- Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos;
- Etanol 100% por 30 segundos;
- Etanol 85% por 30 segundos;

- Etanol 70% por 30 segundos.

As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada.

Para recuperação de antígenos, uma solução tampão TRIS/EDTA {Trizma Base 10mM (Sigma T1503) + EDTA 1 mM (Sigma E5134)} pH=9,0 foi fervida em panela de pressão (Eterna, Nigro®) destampada. As lâminas mergulhadas nesta solução e lacradas com a válvula de segurança da panela aberta. Após a saída do vapor saturado, a válvula de segurança foi abaixada e aguardou-se a pressurização total. Contou-se 4 minutos após esse tempo. Deixou-se a panela fechada, sob água corrente, até a despressurização total. Destampou-se a panela com as lâminas e lavaram-se as lâminas em água corrente e destilada

Procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3,0%, (água oxigenada 10 vol.) com 4 trocas de 5 minutos, e em seguida lavou-se em água corrente e destilada

Lavou-se com solução salina tamponada com fosfato (PBS - phosphate buffered saline) 10mM pH=7,4 por 5 minutos.

Incubaram-se as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido conforme tabela abaixo (Tabela 1) em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1,0% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, por 30 min. a 37,0°C e por 18 horas a 4,0°C em câmara úmida.

Tabela 1 – Pannel de anticorpos utilizados.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
Anti-TFE3	Policlonal feito em Coelho cat# ab70008	1:100	Abcam, Cambridge, MA, EUA
Anti-FABP4	Policlonal feito em Coelho cat# ab13979	1:200	Abcam, Cambridge, MA, EUA
Anti-PPARG	Policlonal feito em Coelho cat# ab59256	1:50	Abcam, Cambridge, MA, EUA
Anti-VEGFR1	Monoclonal feito em Coelho para VEGF Receptor 1 cat# [Y103] ab32152	1:100	Abcam, Cambridge, MA, EUA
Anti-IFI16	Monoclonal feito em Rato cat# ab55328	1:100	Abcam, Cambridge, MA, EUA
Anti-IMP3	Monoclonal feito em Rato cat# ab82044	pronto para uso	Abcam, Cambridge, MA, EUA

Lavou-se em PBS, com 3 trocas de 3 minutos cada.

Incubou-se por 30 min. a 37,0 °C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido).

Lavou-se com PBS, com 3 trocas de 3 min cada.

Incubou-se com o NovoLink Polymer por 30 min. a 37,0° C

Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Incubou-se as lâminas em solução substrato {100 mg de tetrahidroclorato de 3,3'- diaminobenzidina (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1,0 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1,0 mL de H₂O₂ 6,0% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS}; por 5 minutos a 37,0°C, ao abrigo da luz.

Observou-se ao microscópio, nos controles positivos, o desenvolvimento de precipitado castanho-dourado, como produto final da reação.

Lavou-se em água corrente e água destilada por 3 minutos.

Contracorou-se com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.

Lavou-se bem em água corrente e destilada

Imergiu-se 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.

Desidratou-se as lâminas sequencialmente em:

- Etanol 80%, 30 segundos;
- Etanol 95%, 30 segundos;
- Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada;
- Xilol 4 vezes, 30 segundos cada;

Montaram-se as lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha).

4.6 LEITURA DAS LÂMINAS

A análise da expressão imunoistoquímica das proteínas supracitadas foi realizada por um patologista, sem informação das características clínicas dos pacientes. As representações histológicas dos tumores, nos TMAs e suas duplicatas, foram avaliadas ao microscópio óptico (Olympus BX41) em aumento de 400x. Foram consideradas as marcações nucleares, citoplasmáticas e de membrana conforme as localizações específicas de cada proteína analisada.

Com relação à avaliação das proteínas serão considerados escores de intensidade de positividade e de porcentagem de células marcadas em cada amostra tumoral e sua duplicata.

A gradação quanto à intensidade será definida como: negativa, expressão fraca, moderada ou forte, e não avaliável para as proteínas com marcações

citoplasmáticas FABP4 e de membrana (VEGFR1 tem expressão tanto citoplasmática como de membrana).

Para as proteínas IFI16, PPARG e TFE3 com expressão nuclear foi definida a gradação de intensidade e o número de células marcadas utilizando-se a seguinte gradação: negativo, 1-20%, 20-50% e acima de 50% de células com expressão nuclear da proteína a ser analisada.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos prontuários foram digitados e arquivados em planilha do software Excel da Microsoft. Para as variáveis quantitativas foram apresentadas as principais medidas resumo, como média, desvio-padrão, valor mínimo e valor máximo e para as variáveis qualitativas foram apresentadas as respectivas distribuições de frequências absolutas e relativas.

Associações entre variáveis qualitativas e os marcadores foram avaliadas por meio do teste qui-quadrado. No caso de frequências esperadas inferiores a cinco foi realizada a correção de continuidade proposta por YATES (1934).

A sobrevida global foi avaliada da data do diagnóstico até a data da morte por qualquer causa. A sobrevida livre de doença foi avaliada da data do diagnóstico até a data da progressão de doença locorregional, progressão de doença à distância ou morte. Os pacientes perdidos para seguimento foram censurados na última consulta médica onde se tinha registro de estarem vivos. Pacientes vivos ou sem progressão na última consulta de retorno foram censurados nesta data.

Nas análises de sobrevida global e livre de doença/progressão, foi empregada a técnica de Kaplan-Meier. A diferença entre curvas de sobrevida foi avaliada pelo teste de Logrank. O nível de significância adotado foi o de 5%.

Na análise de sobrevida múltipla foi empregado o modelo de riscos proporcionais de Cox. Devido ao grande número de informação não encontrada nos prontuários, optou-se por incluir no modelo múltiplo apenas as variáveis clínicas: Breslow, estágio e acometimento linfonodal, além dos marcadores.

O software livre R versão 2.13 foi empregado na análise estatística (R Development Core Team (2010); Vienna, Áustria, <http://www.R-project.org>).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DA AMOSTRA

Após término do levantamento, identificamos 108 pacientes (60,0%) do sexo feminino e 72 pacientes (40,0%) do sexo masculino. Destes, a maioria 121 pacientes (86,4,%) era de cor branca. A idade média dos pacientes foi de 55,24 anos, com uma mediana de 55 anos (Tabela 2).

Em relação às características do tumor, as lesões foram mais frequentemente encontradas no tronco, sendo esta região acometida em 64 pacientes (35,6%), seguida de pés (23,3%). Noventa e dois por cento das lesões estavam em fase de crescimento vertical, e a maioria não apresentava regressão (85,9%), nem ulceração (67,8%). Apenas 12,6% dos pacientes tinham tumores com Índice Mitótico >10 mitoses/campo.

O tamanho médio das lesões foi de 2,26 cm (1,80 cm mediana). A maior parte dos pacientes apresentava lesões profundas, com índice de Breslow (3,47mm) e nível de Clark III (41,0%) (Tabela 3).

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes com diagnóstico de melanoma quanto as características demográficas.

Variável	Categoria	N	(%)
Gênero	Feminino	108	60,0
	Masculino	72	40,0
	Não Informado	21	
Cor	Amarela	4	2,9
	Branca	121	86,4
	Negra	7	5,0
	Parda	8	5,7
	Não Informado	61	
Idade	Média (Desvio Padrão)	55,24	(16,5)
	Mediana	55,00	
	Não Informado	23	

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes com diagnóstico de melanoma em relação as características patológicas.

Variável	Categoria	N	(%)
Localização	Cabeça/Pescoço	12	6,7
	Mãos	6	3,3
	MMII	35	19,4
	MMSS	21	11,7
	Pés	42	23,3
	Tronco	64	35,6
	Não Informado		21
Crescimento	Radial	13	7,6
	Vertical	157	91,8
	Vertical e Radial	1	0,6
	Não Informado		30
Clark	I	19	10,1
	II	18	9,6
	III	77	41,0
	IV	46	24,5
	V	28	14,9
	Não informado		21
Ulceração	Não	116	67,8
	Sim	55	32,2
	Não Informado	30	
Regressão	Não	146	85,9
	Sim	24	14,1
	Não Informado		31
Índice Mitótico	<10	146	87,6
	>10	21	12,6
	Não informado		34
Tamanho (cm)	Média (Desvio padrão)		2,26 (1,69)
	Mediana		1,80
Breslow (mm)	Média (Desvio padrão)		3,47 (3,72)
	Mediana		2,20

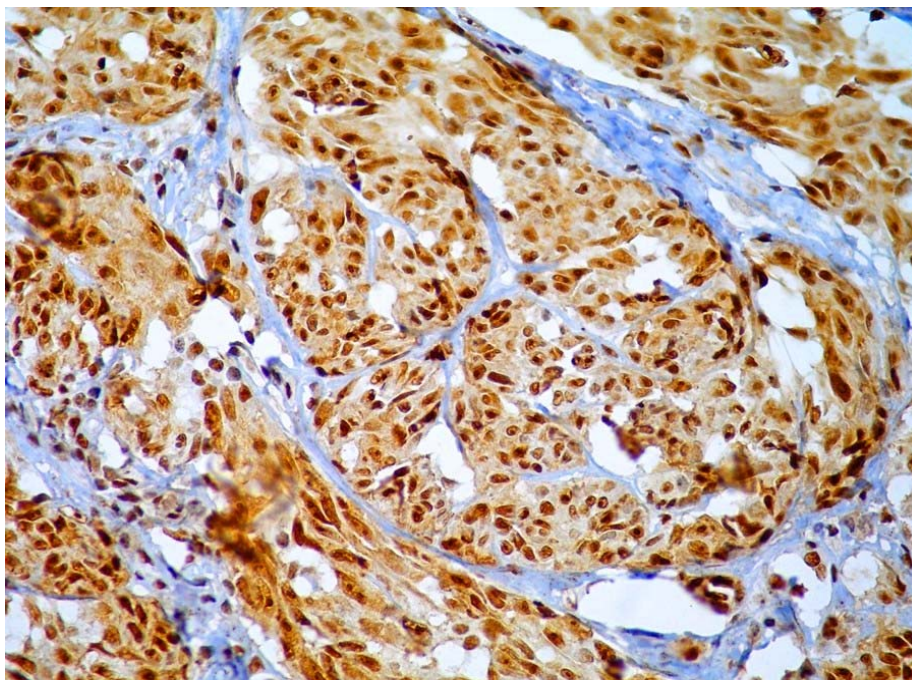
5.2 EXPRESSÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS (FABP4, IFI16, TFE3, VEGFR1, PPARG, IMP3)

IFI16 apresentou marcação nuclear (Figura 1) e esteve expresso em 54% dos casos (Tabela 4). A marcação positiva para IFI16 foi mais frequente nos indivíduos cujas lesões tinham Breslow $\leq 2,0$ mm; sem ulceração; apresentavam regressão e eram do tipo extensivo superficial (Tabela 5).

Tabela 4 - Distribuição da expressão dos diversos marcadores no TMA.

	Negativo	Positivo	Faltante	Total
Marcador	N (%)	N (%)	N	N
IFI16	67 (46)	80 (54)	54	201
FABP4	27 (20)	110 (80)	64	201
TFE3	71 (56)	56 (44)	74	201
VEGFR1	55 (42)	75 (58)	71	201
PPARG	32 (25)	98 (75)	71	201

As percentagens demonstradas na tabela acima referem-se apenas aos casos avaliáveis.



Legenda: Microfotografia representativa de corte histológico de melanoma acral, mostrando marcação nuclear forte uniforme para IFI16. As lâminas foram reveladas com DAB e contracoradas com hematoxilina de Harris (400x).

Figura 1 – Expressão nuclear de IFI16.

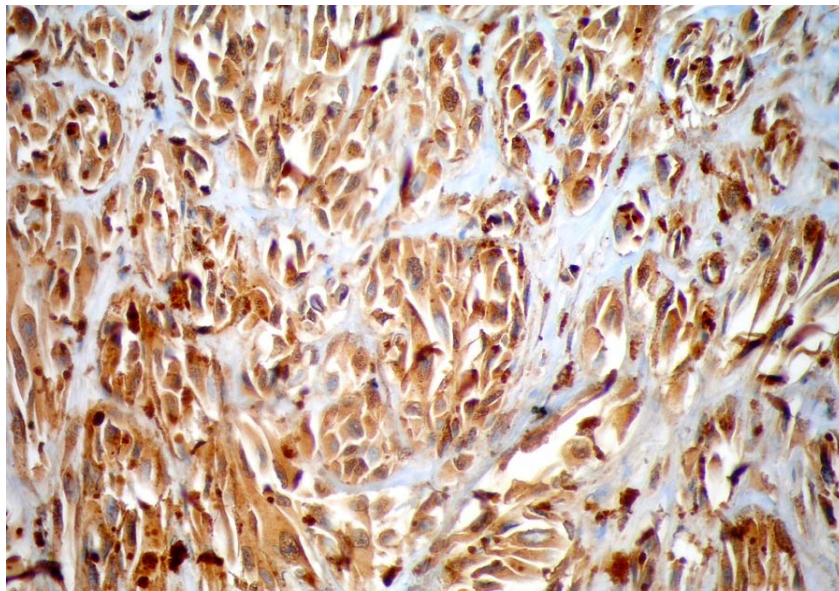
Tabela 5 – Associação entre as características clínico-patológicas dos tumores com a expressão de IFI16.

IFI16					
Característica	Categoria	Negativo N (%)	Positivo N (%)	Total	p
Localização	Cabeça/Pescoço	4 (50)	4 (50)	8	0,09
	MMII	34 (57)	26 (43)	60	
	MMSS	6 (33)	12 (67)	18	
	Tronco	15 (34)	29 (66)	44	
Crescimento	Radial	3 (33)	6 (67)	9	0,736
	Vertical	51 (45)	62 (55)	113	
Clark	≤III	34 (42)	46 (58)	80	0,2835
	IV ou V	30 (52)	28 (48)	58	
Breslow (mm)	≤2	16 (33)	33 (67)	49	0,04
	>2	37 (52)	34 (48)	71	
Índice Mitótico	≤10	43 (42)	60 (58)	103	0,5349
	>10	8 (50)	8 (50)	16	
Ulceração	Não	26 (34)	50 (66)	76	0,004
	Sim	28 (61)	18 (39)	46	
Regressão	Não	51 (47)	58 (53)	109	0,045
	Sim	2 (17)	10 (83)	12	
Estádio	<i>In situ</i> ou I	18 (33)	37 (67)	55	0,0095
	II ou III	22 (47)	25 (53)	47	
	IV	19 (68)	9 (32)	28	
Acometimento Linfonodal	Não	45 (44)	57 (56)	102	0,7081
	Sim	13 (48)	14 (52)	27	
Tipo	Acral	29 (62)	18 (38)	47	0,007
	Extensivo	38 (38)	62 (62)	100	

Foi empregado teste de Qui-quadrado para avaliar a associação das variáveis, considerando-se o resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

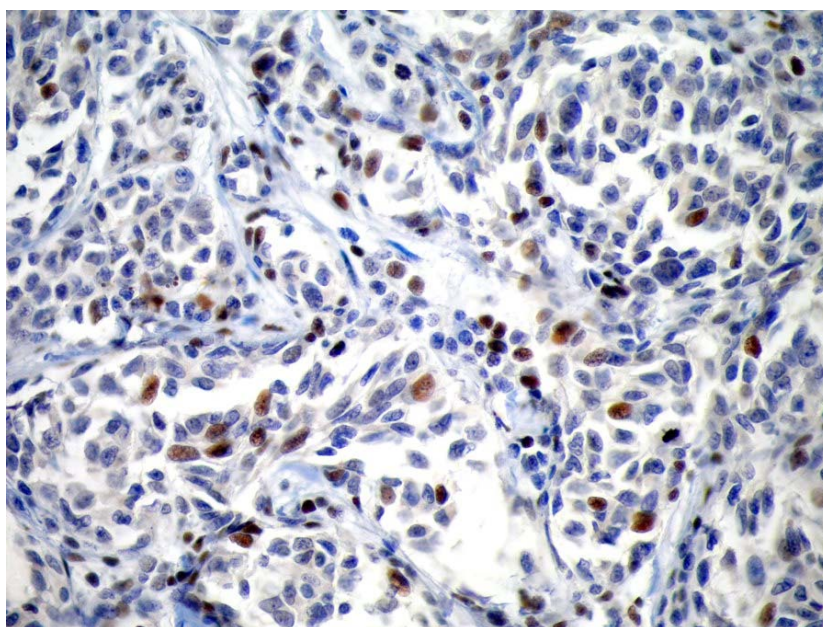
FABP4 apresentou marcação citoplasmática, como esperado (Figura 2), e esteve expresso em 110 (80%) casos (Tabela 4). A expressão de FABP4 esteve significativamente associada com Breslow, com o tipo e com estágio (Tabela 6). A expressão de FABP4 foi mais frequente entre os indivíduos cujas lesões

apresentavam Breslow $\leq 2,0\text{mm}$; apresentavam-se em estádios mais iniciais (*in situ* e estágio I) e eram do tipo extensivo superficial.



Legenda: Microfotografia representativa de corte histológico de melanoma, mostrando marcação citoplasmática forte para FABP4. As lâminas foram reveladas com DAB e contracoradas com hematoxilina de Harris (400x).

Figura 2 – Expressão citoplasmática de FABP4.



Legenda: Microfotografia representativa de corte histológico de melanoma, mostrando marcação nuclear forte, embora descontínua, para TFE3. As lâminas foram reveladas com DAB e contracoradas com hematoxilina de Harris (400x).

Figura 3 – Expressão nuclear de TFE3.

Tabela 6 – Associação entre as características clínico-patológicas dos tumores com a expressão de FABP4.

		FABP4		Total	p
Característica	Categoria	Negativo N (%)	Positivo N (%)		
Localização	Cabeça/pescoço	2 (29)	5 (71)	7	0,7281
	MMII	10 (18)	46 (82)	56	
	MMSS	2 (12)	15 (88)	17	
	Tronco	6 (14)	37 (86)	43	
Crescimento	Radial	1 (13)	7 (87)	8	0,8603
	Vertical	18 (17)	89 (83)	107	
Clark	≤III	13 (17)	62 (83)	75	0,5551
	IV ou V	12 (21)	44 (79)	56	
Breslow (mm)	≤2	1 (3)	42 (97)	43	0,0008
	>2	19 (27)	51 (73)	70	
Índice Mitótico	≤10	15 (16)	78 (84)	93	0,8527
	>10	4 (21)	15 (79)	19	
Ulceração	Não	10 (14)	62 (86)	72	0,3252
	Sim	9 (21)	34 (79)	43	
Regressão	Não	19 (19)	83 (81)	102	0,2193
	Sim	0 (0)	12 (100)	12	
Estádio	<i>In situ</i> ou I	2 (4)	46 (96)	48	0,005
	II ou III	9 (19)	38 (81)	47	
	IV	9 (32)	19 (68)	28	
Acometimento Linfonodal	Não	17 (18)	78 (82)	95	0,5853
	Sim	3 (11)	24 (89)	27	
Tipo	Acral	15 (33)	31 (67)	46	0,007
	Extensivo	12 (13)	79 (87)	91	

Foi empregado teste de Qui-quadrado para testar a associação entre as variáveis, considerando-se o resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

Quarenta e quatro por cento dos tumores apresentaram expressão de TFE3 (Tabela 4), sendo sua expressão nuclear (Figura 3). A expressão de TFE3 esteve associada com regressão e com o tipo (Tabela 7). A expressão deste marcador foi

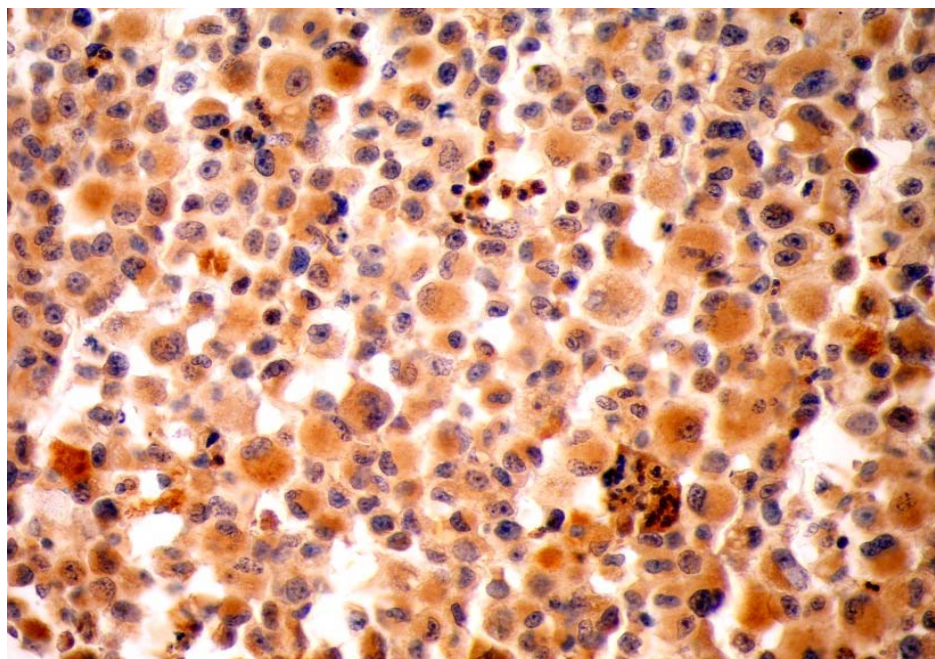
mais frequente nos casos onde as lesões apresentavam regressão e eram do tipo extensivo superficial.

Tabela 7 – Associação entre as características clínico-patológicas dos tumores com a expressão de TFE3.

		TFE3		Total	p
Característica	Categoria	Negativo N (%)	Positivo N (%)		
Localização	Cabeça/pescoço	5 (71)	2 (29)	7	0,147
	MMII	35 (63)	21 (37)	56	
	MMSS	7 (44)	9 (56)	16	
	tronco	15 (42)	21 (58)	36	
Crescimento	Radial	5 (63)	3 (37)	8	0,9865
	Vertical	56 (55)	45 (45)	101	
Clark	<=III	39 (57)	29 (43)	68	0,8423
	IV ou V	30 (56)	24 (44)	54	
Breslow (mm)	<=2	17 (46)	20 (54)	37	0,2125
	>2	41 (59)	29 (41)	70	
Índice Mitótico	<=10	49 (56)	39 (44)	88	0,659
	>10	9 (50)	9 (50)	18	
Ulceração	Não	34 (51)	33 (49)	67	0,1658
	Sim	27 (64)	15 (36)	42	
Regressão	Não	57 (59)	40 (41)	97	0,046
	Sim	3 (27)	8 (73)	11	
Estádio	<i>In situ</i> ou I	21 (48)	23 (52)	44	0,1193
	II ou III	23 (50)	23 (50)	46	
	IV	18 (72)	7 (28)	25	
Acometimento linfonodal	Não	49 (55)	40 (45)	89	0,532
	Sim	12 (48)	13 (52)	25	
Tipo	Acral	32 (73)	12 (27)	44	0,005
	Extensivo	39 (47)	44 (53)	83	

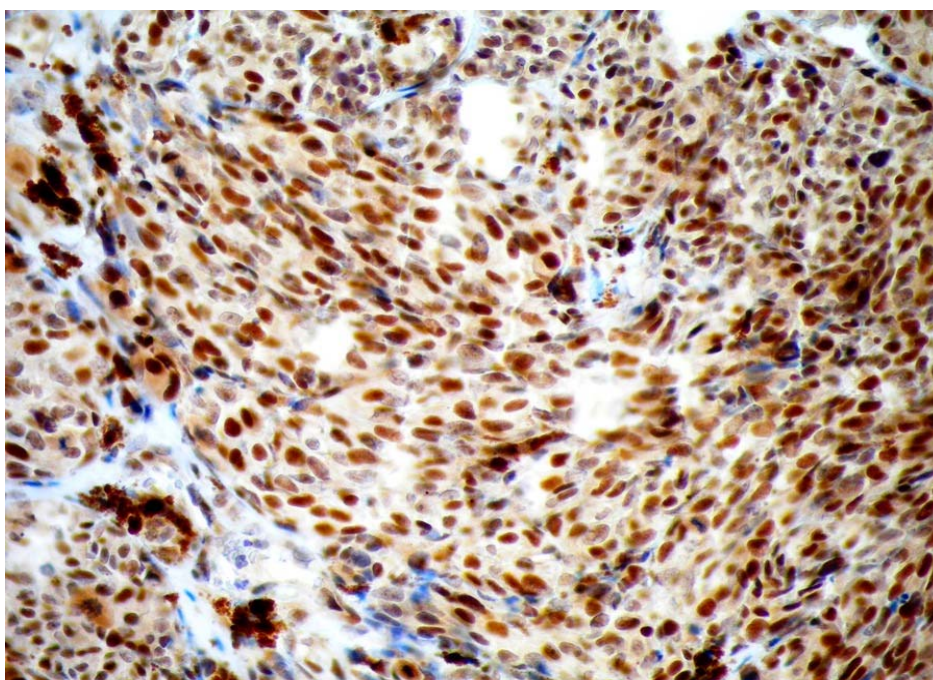
Foi empregado teste de Qui-quadrado para testar a associação entre as variáveis, considerando-se o resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

VEGFR1 apresentou marcação, preponderantemente, citoplasmática (Figura 4) e esteve expresso em 58% dos casos (Tabela 4). A expressão de VEGFR1 esteve associada significativamente com Breslow e com estadiamento (Tabela 8). A expressão positiva foi mais frequentemente observada nos casos cujas lesões tinham Breslow $\leq 2,0$ mm e apresentavam-se em estágio inicial (*in situ* e estágio I).



Legenda: Microfotografia representativa de corte histológico de melanoma, mostrando marcação citoplasmática forte e homogênea para VEGFR1. As lâminas foram reveladas com DAB e contracoradas com hematoxilina de Harris (400x).

Figura 4 – Expressão citoplasmática de VEGFR1.



Legenda: Microfotografia representativa de corte histológico de melanoma mostrando marcação nuclear forte para PPARG. As lâminas foram reveladas com DAB e contracoradas com hematoxilina de Harris (400x).

Figura 5 – Expressão nuclear de PPARG.

Tabela 8 – Associação entre as características clínico-patológicas dos tumores com a expressão de VEGFR1.

VEGFR1					
Característica	Categoria	VEGFR1		Total	p
		Negativo N (%)	Positivo N (%)		
Localização	Cabeça/Pescoço	3 (43)	4 (57)	7	0,8602
	MMII	20 (36)	36 (64)	56	
	MMSS	7 (44)	9 (56)	16	
	Tronco	17 (44)	22 (56)	39	
Crescimento	Radial	2 (22)	7 (78)	9	0,4275
	Vertical	41 (42)	57 (58)	98	
Clark	≤III	26 (37)	44 (63)	70	0,3044
	IV ou V	25 (46)	29 (54)	54	
Breslow (mm)	≤2	10 (26)	28 (74)	38	0,017
	>2	34 (50)	34 (50)	68	
Índice Mitótico	≤10	33 (38)	53 (62)	86	0,4688
	>10	9 (47)	10 (53)	19	
Ulceração	Não	23 (35)	42 (65)	65	0,2475
	Sim	20 (47)	23 (53)	43	
Regressão	Não	42 (43)	55 (57)	97	0,08
	Sim	1 (10)	9 (90)	10	
Estádio	In situ ou I	9 (21)	34 (79)	43	0,003
	II ou III	27 (56)	21 (44)	48	
	IV	11 (41)	16 (59)	27	
Acometimento linfonodal	Não	39 (42)	53 (58)	92	0,3473
	Sim	8 (32)	17 (68)	25	
Tipo	Acral	20 (48)	22 (52)	42	0,3971
	Extensivo	35 (40)	53 (60)	88	

Foi empregado teste de Qui-quadrado para testar a associação entre as variáveis, considerando-se o resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

Setenta e cinco por cento das amostras apresentaram marcação positiva para PPARG (Tabela 4), sendo observada constantemente marcação nuclear (Figura 5). A imunomarcação para PPARG associou-se com um Clark ≤III e esteve mais expresso nos melanomas extensivos superficiais (Tabela 9).

Não foi possível realizar a leitura de um dos marcadores em 26 a 36,8% dos casos, dependendo do marcador avaliado (Tabela 4), em vista de perda de “spots”, pouca amostra no “spot” ou marcação inadequada.

Tabela 9 – Associação entre as características clínico-patológicas dos tumores com a expressão de PPARG.

		PPARG		Total	p
Característica	Categoria	Negativo N (%)	Positivo N (%)		
Localização	Cabeça/Pescoço	0 (0)	8 (100)	8	0,1026
	MMII	18 (33)	36 (67)	54	
	MMSS	2 (13)	14 (87)	16	
	Tronco	9 (23)	31 (77)	40	
Crescimento	Radial	4 (67)	2 (33)	6	0,06757
	Vertical	25 (24)	79 (76)	104	
Clark	≤III	12 (17)	59 (83)	71	0,008
	IV ou V	20 (38)	33 (62)	53	
Breslow (mm)	≤2	8 (20)	32 (80)	40	0,3574
	>2	19 (28)	49 (72)	68	
Índice Mitótico	≤10	23 (25)	68 (75)	91	0,7728
	>10	4 (25)	12 (75)	16	
Ulceração	Não	16 (24)	50 (76)	66	0,5363
	Sim	13 (30)	31 (70)	44	
Regressão	Não	25 (26)	70 (74)	95	0,9497
	Sim	3 (21)	11 (79)	14	
Estádio	<i>In situ</i> ou I	9 (20)	37 (80)	46	0,05912
	II ou III	9 (20)	37 (80)	46	
	IV	11 (42)	15 (58)	26	
Acometimento Linfonodal	Não	19 (21)	72 (79)	91	0,1477
	Sim	9 (35)	17 (65)	26	
Tipo	Acral	17 (40)	25 (60)	42	0,004
	Extensivo	15 (17)	73 (83)	88	

Foi empregado teste de Qui-quadrado para testar a associação entre as variáveis, considerando-se o resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

Testamos também a associação da expressão dos marcadores entre si, como proposto nos objetivos. Os resultados podem ser vistos nas tabelas abaixo (Tabelas 10, 11, 12 e 13).

Tabela 10 – Associação da expressão de IFI16 com a expressão dos demais marcadores. Os melanomas in situ foram excluídos desta análise.

IFI16				
Marcadores	Negativo N (%)	Positivo N (%)	Total	p
FABP4				
Negativo	11 (46)	13 (54)	24	0,7969
Positivo	41 (49)	43 (51)	84	
TFE3				
Negativo	35 (61)	22 (39)	57	0,002
Positivo	14 (30)	32 (70)	46	
VEGFR1				
Negativo	21 (45)	26 (55)	47	0,4178
Positivo	29 (53)	26 (47)	55	
PPARG				
Negativo	21 (81)	5 (19)	26	0,0002
Positivo	30 (39)	47 (61)	77	

Foi empregado teste de Qui-quadrado para testar a associação dos marcadores entre si, considerando-se o resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

A expressão de IFI16 apresentou associação significativa com a expressão dos marcadores TFE3 ($p=0,002$) e PPARG ($p=0,0002$) (Tabela 10).

A expressão de FABP4 apresentou associação significativa com a expressão do marcador VEGFR1 ($p < 0,0001$) (Tabela 11).

A expressão de TFE3 apresentou associação significativa com a expressão do marcador PPARG ($p=0,012$) (Tabela 12).

Tabela 11 – Associação da expressão de FABP4 com a expressão dos demais marcadores. Os melanomas *in situ* foram excluídos desta análise.

FABP4				
Marcadores	Negativo	Positivo	Total	p
	N (%)	N (%)		
TFE3				
Negativo	14 (25)	41 (75)	55	0,302
Positivo	8 (17)	39 (83)	47	
VEGFR1				
Negativo	19 (40)	29 (60)	48	<0.0001
Positivo	4 (7)	51 (93)	55	
PPARG				
Negativo	3 (12)	23 (88)	26	0,2375
Positivo	16 (22)	56 (78)	72	

Foi empregado teste de Qui-quadrado para testar a associação dos marcadores entre si, considerando-se o resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

Tabela 12 – Associação da expressão de TFE3 com a expressão dos demais marcadores. Os melanomas *in situ* foram excluídos desta análise.

TFE3				
Marcadores	Negativo	Positivo	Total	p
	N (%)	N (%)		
VEGFR1				
Negativo	26 (57)	20 (43)	46	0,9227
Positivo	30 (56)	24 (44)	54	
PPARG				
Negativo	22 (85)	4 (15)	26	0,0003
Positivo	31 (43)	41 (57)	72	

Foi empregado teste de Qui-quadrado para testar a associação dos marcadores entre si, considerando-se o resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

A expressão de VEGFR1 apresentou associação com a expressão de PPARG ($p=0,012$) (Tabela 13).

Tabela 13 – Associação da expressão de PPARG com a expressão dos demais marcadores. Os melanomas *in situ* foram excluídos desta análise.

Marcadores	VEGFR1		Total	p
	Negativo N (%)	Positivo N (%)		
PPARG				
Negativo	6 (24)	19 (76)	25	0,012
Positivo	38 (53)	34 (47)	72	

Foi empregado teste de Qui-quadrado para testar a associação dos marcadores entre si, considerando-se o resultado estatisticamente significativo quando $p<0,05$.

Posteriormente, refizemos as mesmas análises sem a exclusão dos casos de melanoma *in situ* (Tabelas 14, 15, 16 e 17).

Tabela 14 – Associação da expressão de IFI16 com os demais marcadores, incluindo os melanomas *in situ*.

Marcadores	IFI16		Total	p
	Negativo N (%)	Positivo N (%)		
FABP4				
Negativo	12 (48)	13 (52)	25	0,7701
Positivo	47 (45)	58 (55)	105	
TFE3				
Negativo	40 (59)	28 (41)	68	0,0003
Positivo	14 (26)	40 (74)	54	
VEGFR1				
Negativo	23 (44)	29 (56)	52	0,7496
Positivo	33 (47)	37 (53)	70	
PPARG				
Negativo	22 (73)	8 (27)	30	0,0006
Positivo	34 (37)	57 (63)	91	

Foi empregado teste de Qui-quadrado para testar a associação dos marcadores entre si, considerando-se o resultado estatisticamente significativo quando $p<0,05$.

A expressão de IFI16 manteve a associação significativa com a expressão dos marcadores TFE3 ($p=0,0003$) e PPARG ($p=0,0006$) (Tabela 14).

FABP4 apresentou associação significativa com o marcador VEGFR1 ($p<0,0001$) (Tabela 15).

A expressão de TFE3 apresentou associação com a expressão do marcador PPARG ($p=0,0002$) (Tabela 16).

Tabela 15 – Associação da expressão de FABP4 com os demais marcadores, incluindo os melanomas *in situ*.

FABP4				
Marcadores	Negativo	Positivo	Total	p
	N (%)	N (%)		
TFE3				
Negativo	15 (23)	51 (77)	66	0,2534
Positivo	8 (15)	47 (85)	55	
VEGFR1				
Negativo	20 (38)	33 (62)	53	<0,0001
Positivo	4 (6)	66 (94)	70	
PPARG				
Negativo	4 (13)	26 (87)	30	0,5105
Positivo	16 (19)	70 (81)	86	

Foi empregado teste de Qui-quadrado para testar a associação dos marcadores entre si, considerando-se o resultado estatisticamente significativo quando $p<0,05$.

VEGFR1 apresentou associação significativa com o marcador PPARG ($p=0,0467$) (Tabela 17).

Tabela 16 – Associação da expressão de TFE3 com os demais marcadores, incluindo os melanomas *in situ*.

TFE3				
Marcadores	Negativo	Positivo	Total	p
	N (%)	N (%)		
VEGFR1				
Negativo	29 (58)	21 (42)	50	0,8722
Positivo	39 (57)	30 (43)	69	
PPARG				
Negativo	25 (83)	5 (17)	30	0,0002
Positivo	37 (44)	47 (56)	84	

Foi empregado teste de Qui-quadrado para testar a associação dos marcadores entre si, considerando-se o resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

Tabela 17 – Associação da expressão de VEGFR1 com os demais marcadores, incluindo os melanomas *in situ*.

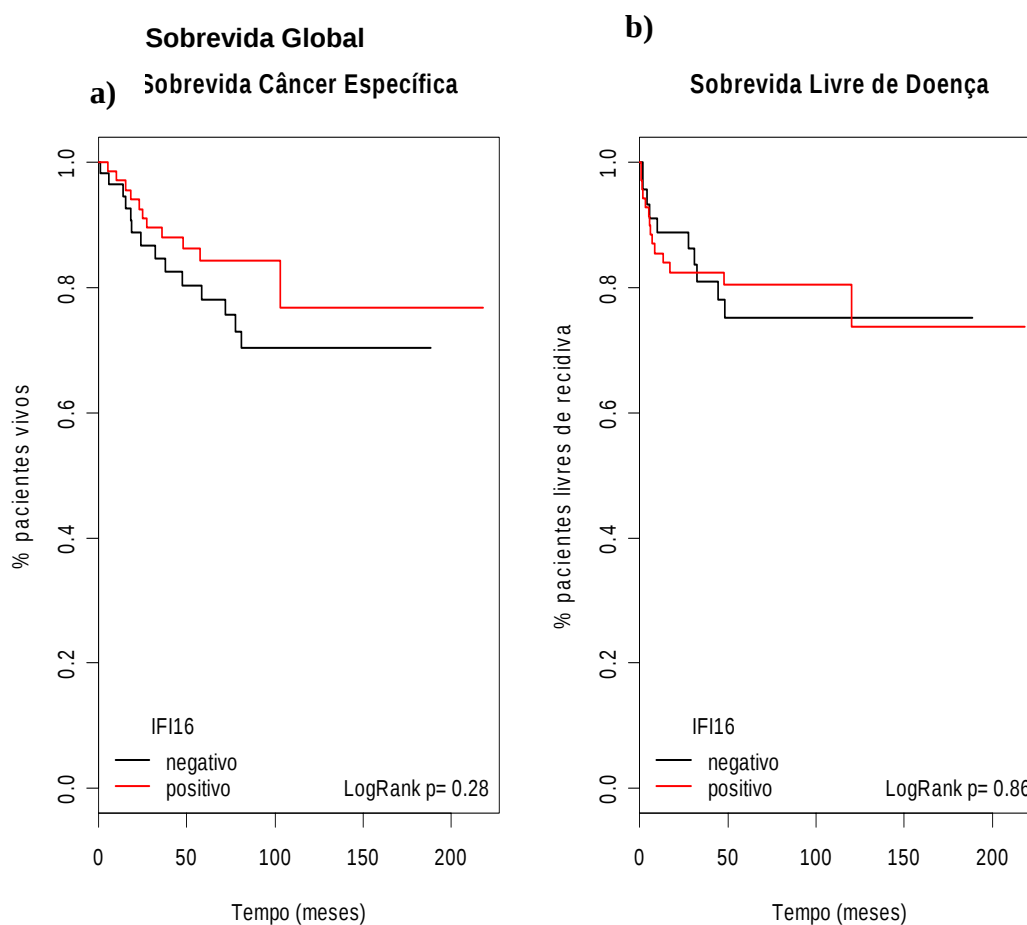
VEGFR1				
	Negativo	Positivo		
Marcador	N (%)	N (%)	Total	p
PPARG				
Negativo	8 (28)	21 (72)	29	0,0467
Positivo	41 (49)	43 (51)	84	

Foi empregado teste de Qui-quadrado para testar a associação dos marcadores entre si, considerando-se o resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

Não conseguimos realizar a padronização do anticorpo IMP3, um dos marcadores selecionados para esta dissertação, mesmo após inúmeras tentativas, com diferentes tampões, marcações com fosfatase alcalina e com DAB. A marcação obtida foi inespecífica e, desta forma, resolvemos excluí-lo da análise. Tentaremos avaliar a possibilidade de utilizar outras estratégias de recuperação antigênica ou outro clone de anticorpos.

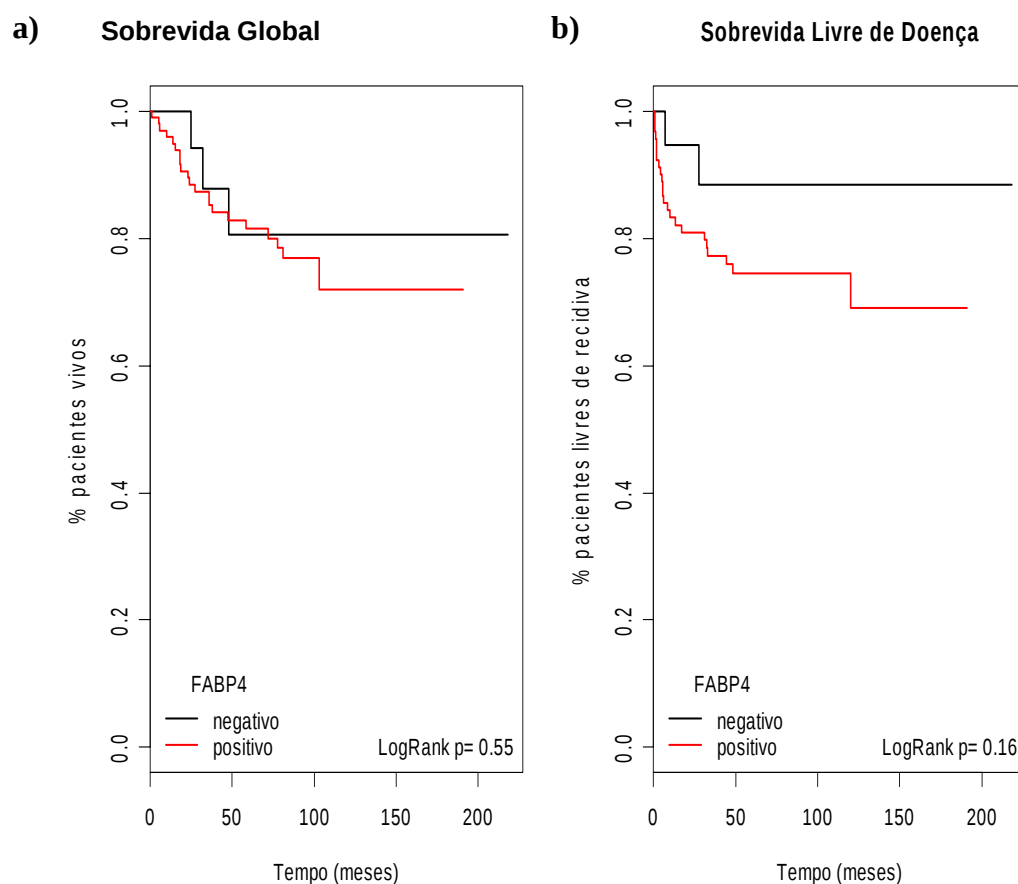
5.3 SOBREVIDA GLOBAL E SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

A expressão dos marcadores por nós avaliados neste estudo aparentemente não influenciou de maneira significativa nem a sobrevida global, nem a sobrevida livre de doença dos pacientes (Figuras 6, 7, 8, 9, 10).



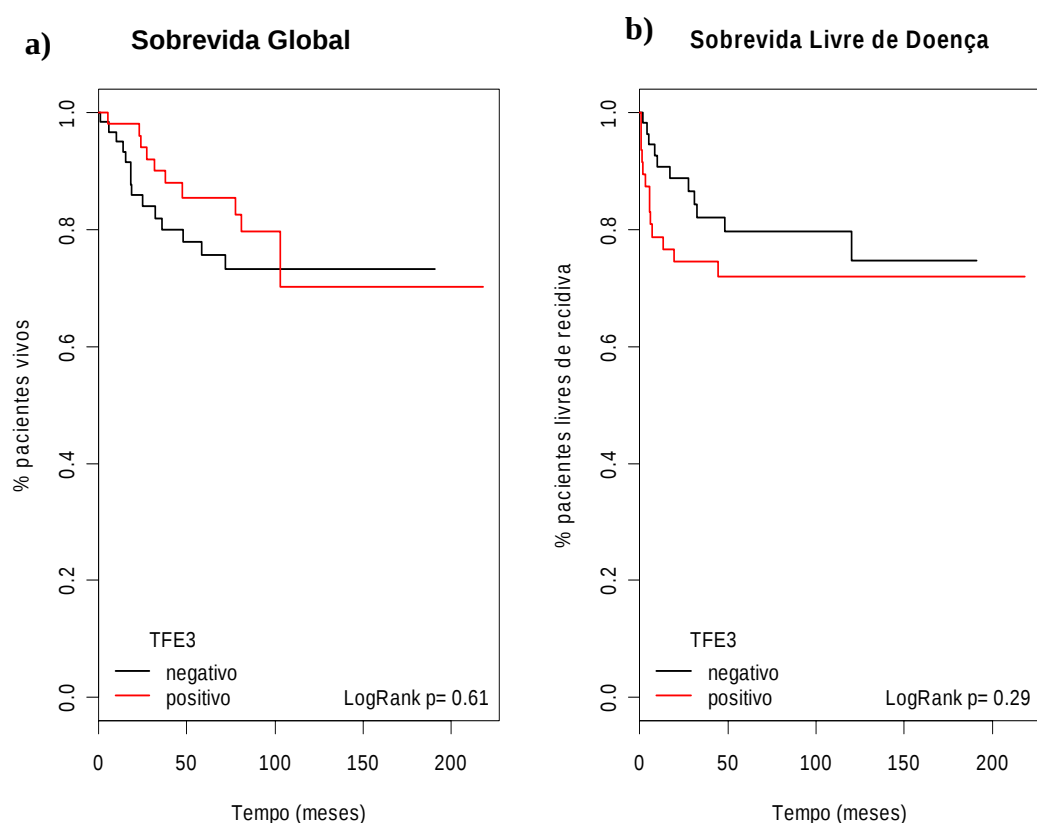
Legenda: **a)** Sobrevida Global com a porcentagem de pacientes vivos em função do tempo em meses de acordo com a expressão do marcador IFI16. **b)** Sobrevida Livre de Doença com a porcentagem de pacientes livres de recidiva em função do tempo em meses de acordo com a expressão de IFI16. O gráfico demonstra que não houve influência estatisticamente significativa da expressão do marcador em nenhuma das duas situações.

Figura 6 – Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão de IFI16. As curvas foram calculadas empregando-se o método de Kaplan-Meier e as comparações foram realizadas com o teste do log-rank considerando-se $p < 0,05$.



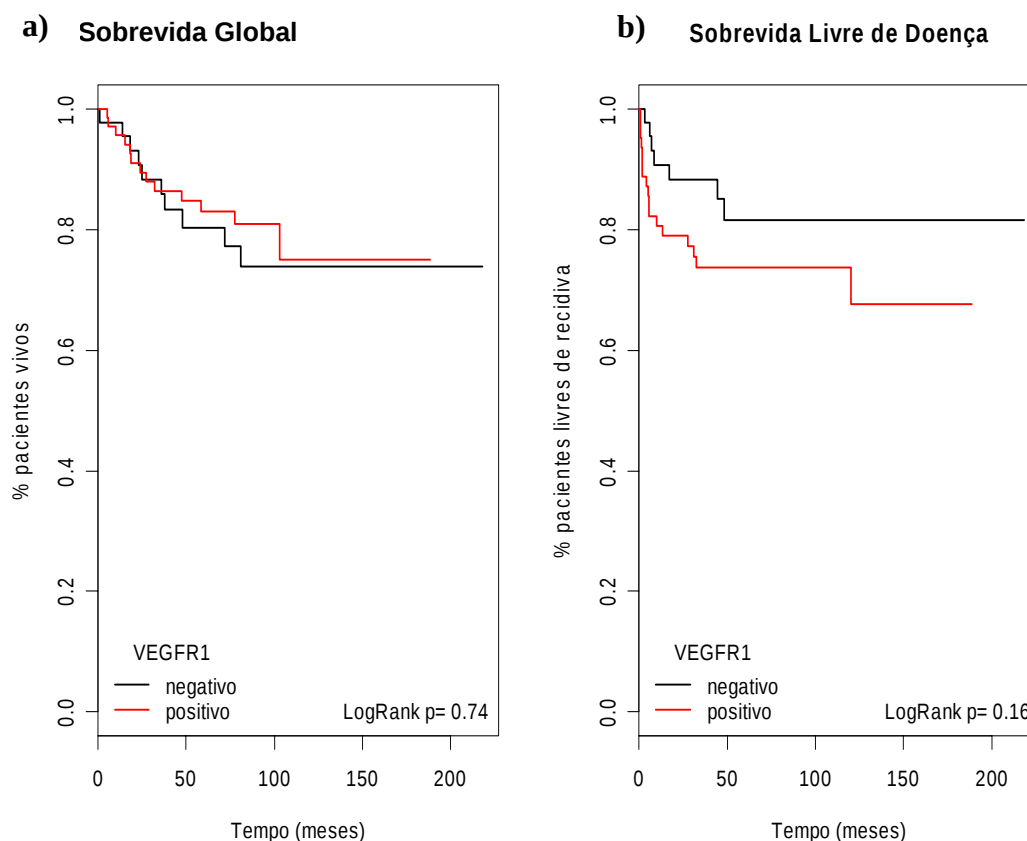
Legenda: **a)** Sobrevida Global com a porcentagem de pacientes vivos em função do tempo em meses de acordo com a expressão do marcador FABP4. **b)** Sobrevida Livre de Doença com a porcentagem de pacientes livres de recidiva em função do tempo em meses de acordo com a expressão de FABP4. O gráfico demonstra que não houve influência estatisticamente significativa da expressão do marcador em nenhuma das duas situações.

Figura 7 – Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão de FABP4. As curvas foram calculadas empregando-se o método de Kaplan-Meier e as comparações foram realizadas com o teste do log-rank considerando-se $p < 0,05$.



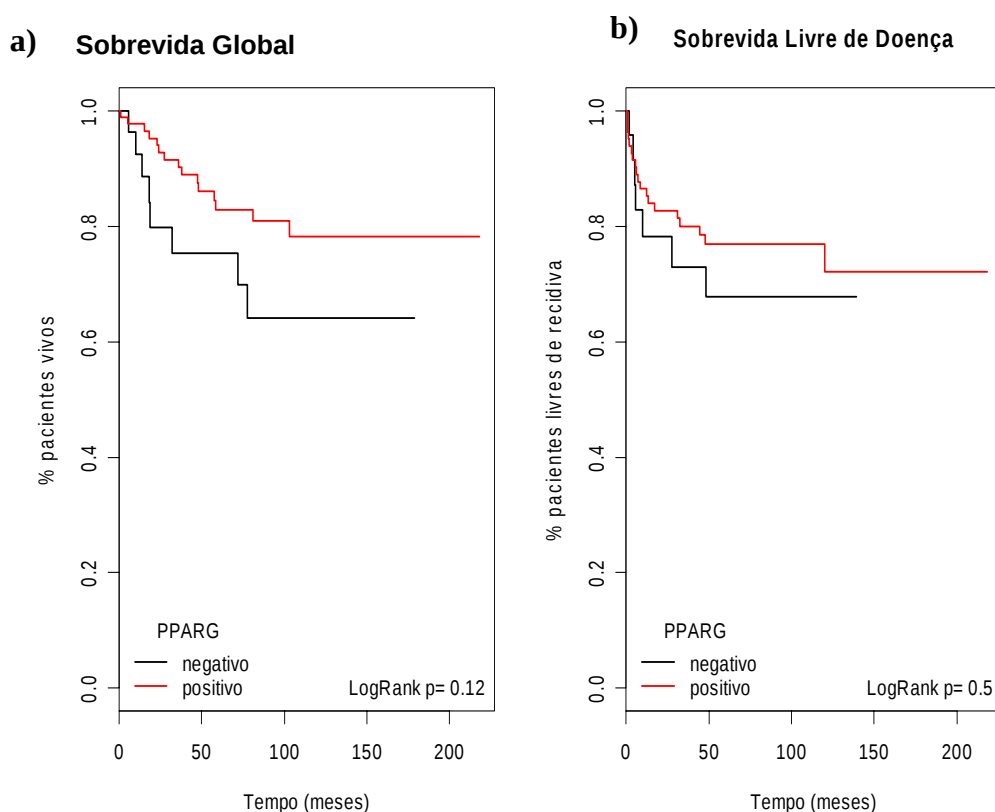
Legenda: **a)** Sobrevida Global com a porcentagem de pacientes vivos em função do tempo em meses de acordo com a expressão do marcador TFE3. **b)** Sobrevida Livre de Doença com a porcentagem de pacientes livres de recidiva em função do tempo em meses de acordo com a expressão de TFE3. O gráfico demonstra que não houve influência estatisticamente significativa da expressão do marcador em nenhuma das duas situações.

Figura 8 – Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão de TFE3. As curvas foram calculadas empregando-se o método de Kaplan-Meier e as comparações foram realizadas com o teste do log-rank considerando-se $p < 0,05$.



Legenda: **a)** Sobrevida Global com a porcentagem de pacientes vivos em função do tempo em meses de acordo com a expressão do marcador VEGFR1. **b)** Sobrevida Livre de Doença com a porcentagem de pacientes livres de recidiva em função do tempo em meses de acordo com a expressão de VEGFR1. O gráfico demonstra que não houve influência estatisticamente significativa da expressão do marcador em nenhuma das duas situações.

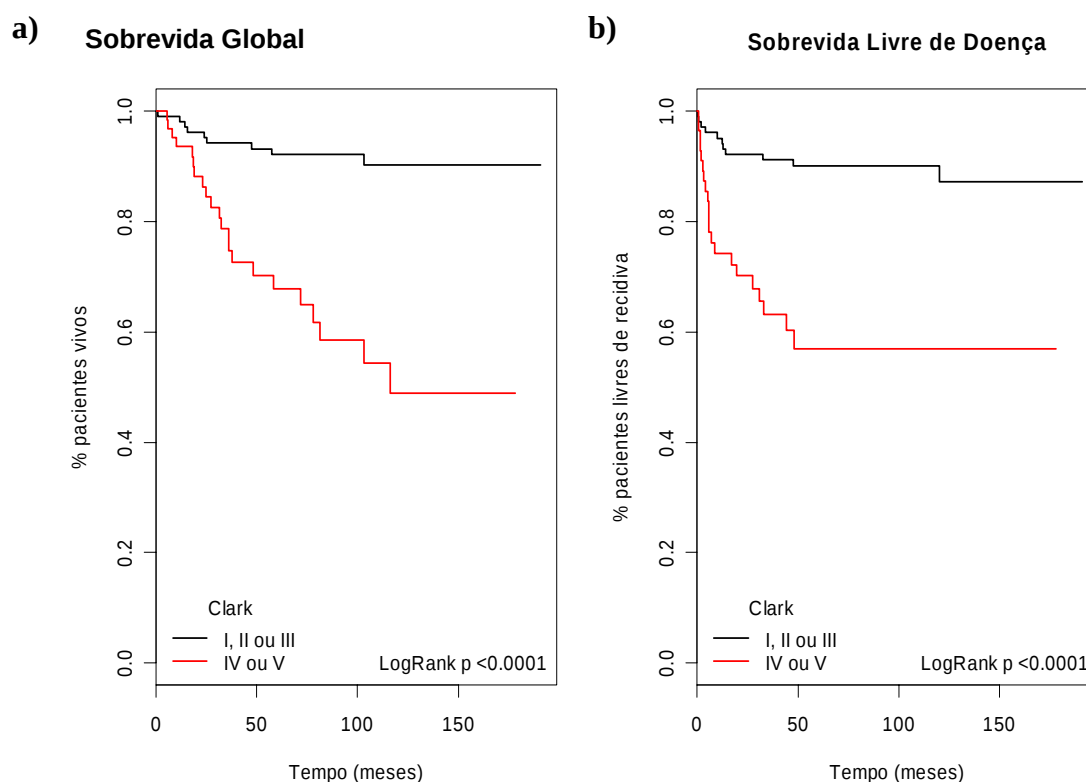
Figura 9 – Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão de VEGFR1. As curvas foram calculadas empregando-se o método de Kaplan-Meier e as comparações foram realizadas com o teste do log-rank considerando-se $p < 0,05$.



Legenda: **a)** Sobrevida Global com a porcentagem de pacientes vivos em função do tempo em meses de acordo com a expressão do marcador PPARG. **b)** Sobrevida Livre de Doença com a porcentagem de pacientes livres de recidiva em função do tempo em meses de acordo com a expressão de PPARG. O gráfico demonstra que não houve influência estatisticamente significativa da expressão do marcador em nenhuma das duas situações.

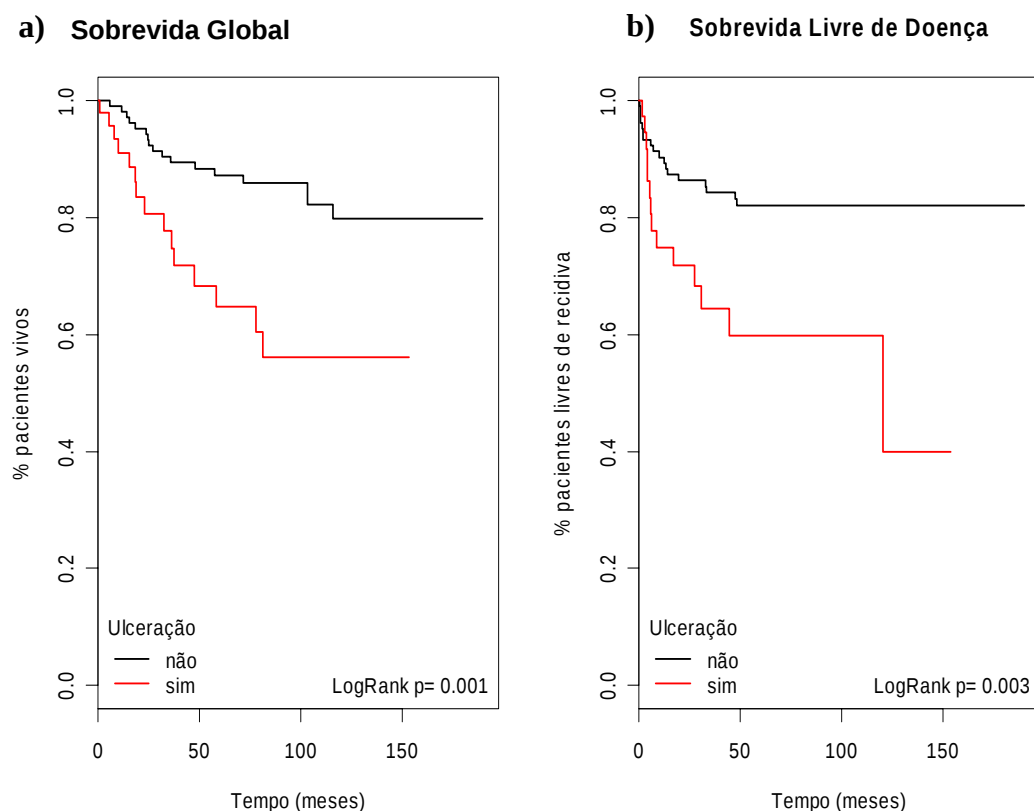
Figura 10 – Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão de PPARG. As curvas foram calculadas empregando-se o método de Kaplan-Meier e as comparações foram realizadas com o teste do log-rank considerando-se $p < 0,05$.

A análise dos resultados das características clínico-patológicas do tumor em relação à sobrevida global e a sobrevida livre de doença dos pacientes demonstraram piora significativa para os níveis de Clarck IV e V (Figura 11), para presença de ulceração (Figura 12) para melanoma do tipo Acral lentiginoso (Figura 13) para estágio III (Figura 14) espessura maior que 2,0 mm (Figura 15) e presença de acometimento linfonodal (Figura 16).



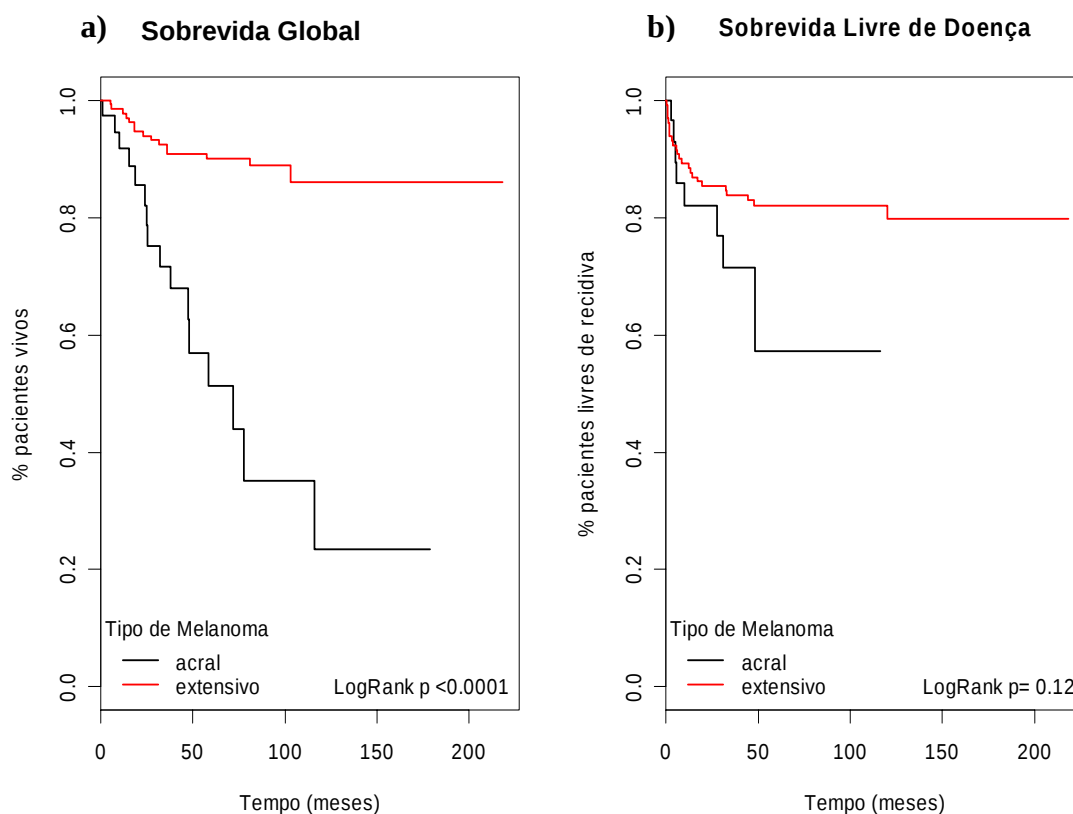
Legenda: **a)** Sobrevida Global com a porcentagem de pacientes vivos em função do tempo em meses de acordo com o nível de Clark. **b)** Sobrevida Livre de Doença com a porcentagem de pacientes livres de recidiva em função do tempo em meses de acordo com o nível de Clark. O gráfico demonstrou sobrevida inferior para tumores nos níveis IV ou V.

Figura 11 – Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com Nível de Clark. As curvas foram calculadas empregando-se o método de Kaplan-Meier e as comparações foram realizadas com o teste do log-rank considerando-se $p < 0,05$.



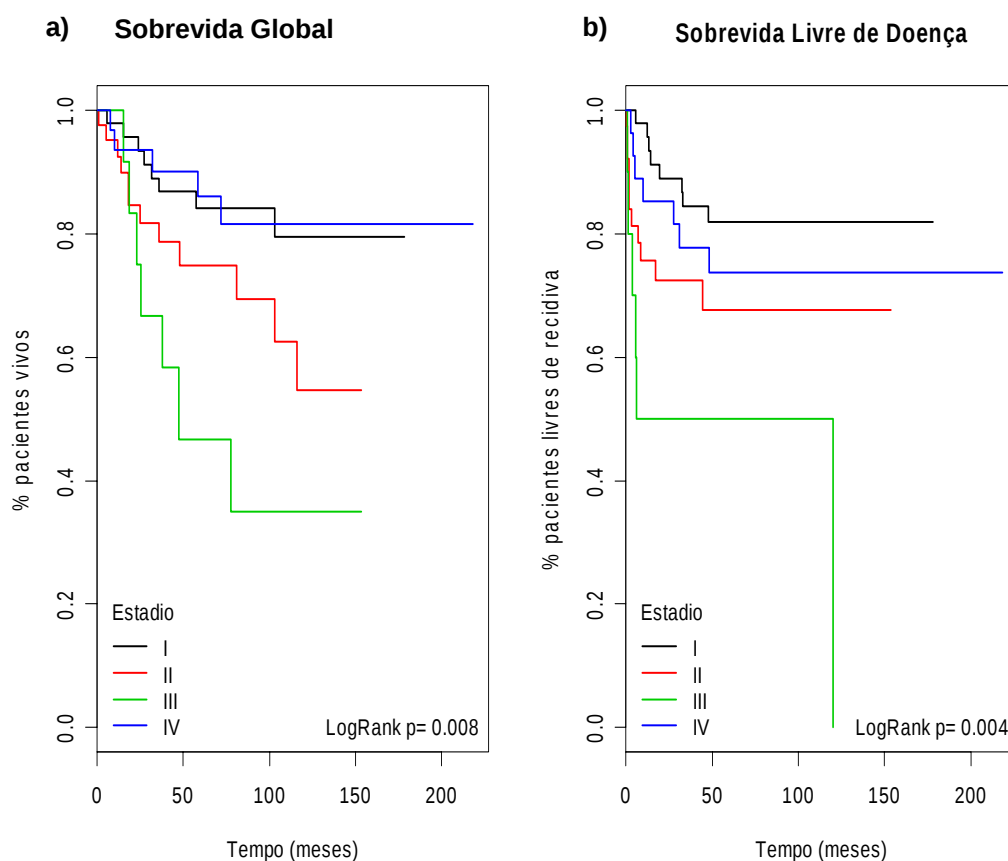
Legenda: **a)** Sobrevida Global com a porcentagem de pacientes vivos em função do tempo em meses de acordo com a ulceração. **b)** Sobrevida Livre de Doença com a porcentagem de pacientes livres de recidiva em função do tempo em meses de acordo com a ulceração. O gráfico demonstrou resultado pior para presença de ulceração.

Figura 12 – Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com a ulceração. As curvas foram calculadas empregando-se o método de Kaplan-Meier e as comparações foram realizadas com o teste do log-rank considerando-se $p < 0,05$.



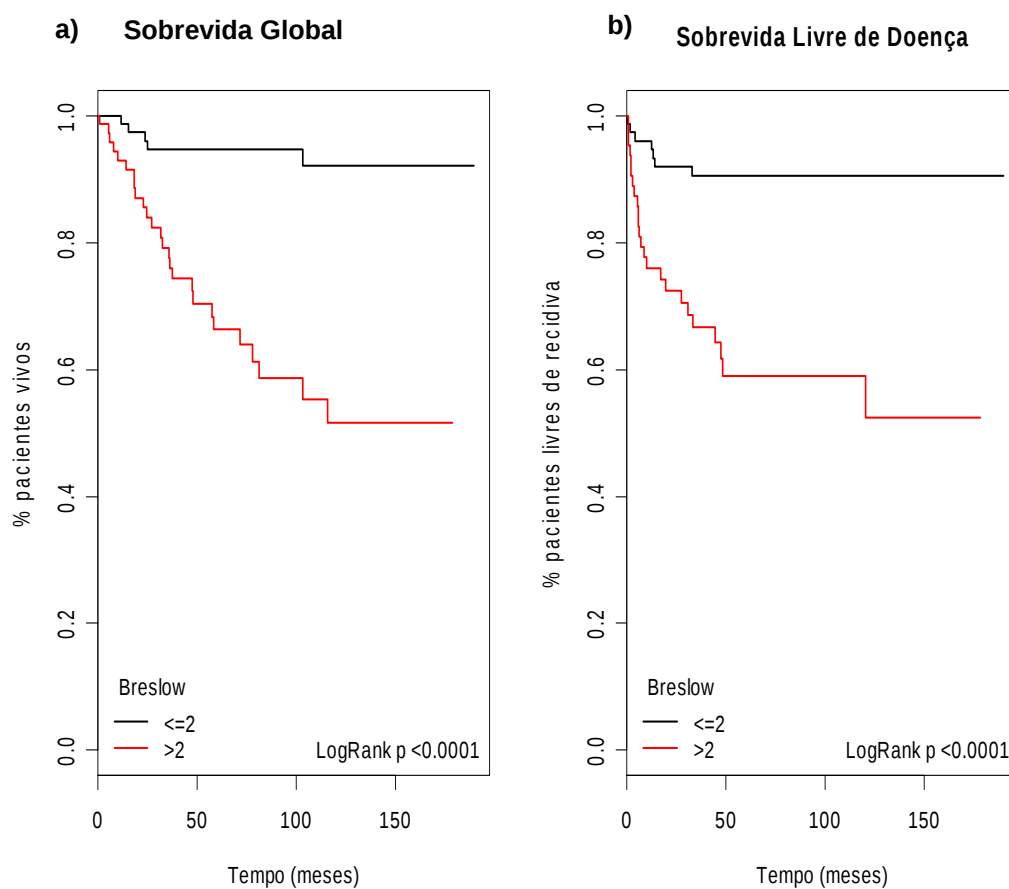
Legenda: **a)** Sobrevida Global com a porcentagem de pacientes vivos em função do tempo em meses de acordo com o tipo de melanoma acral ou extensivo. **b)** Sobrevida Livre de Doença com a porcentagem de pacientes livres de recidiva em função do tempo em meses de acordo com o tipo de melanoma acral ou extensivo. O gráfico demonstrou resultado pior para melanoma do tipo acral.

Figura 13 – Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com tipo de melanoma (acral x extensivo superficial). As curvas foram calculadas empregando-se o método de Kaplan-Meier e as comparações foram realizadas com o teste do log-rank considerando-se $p < 0,05$.



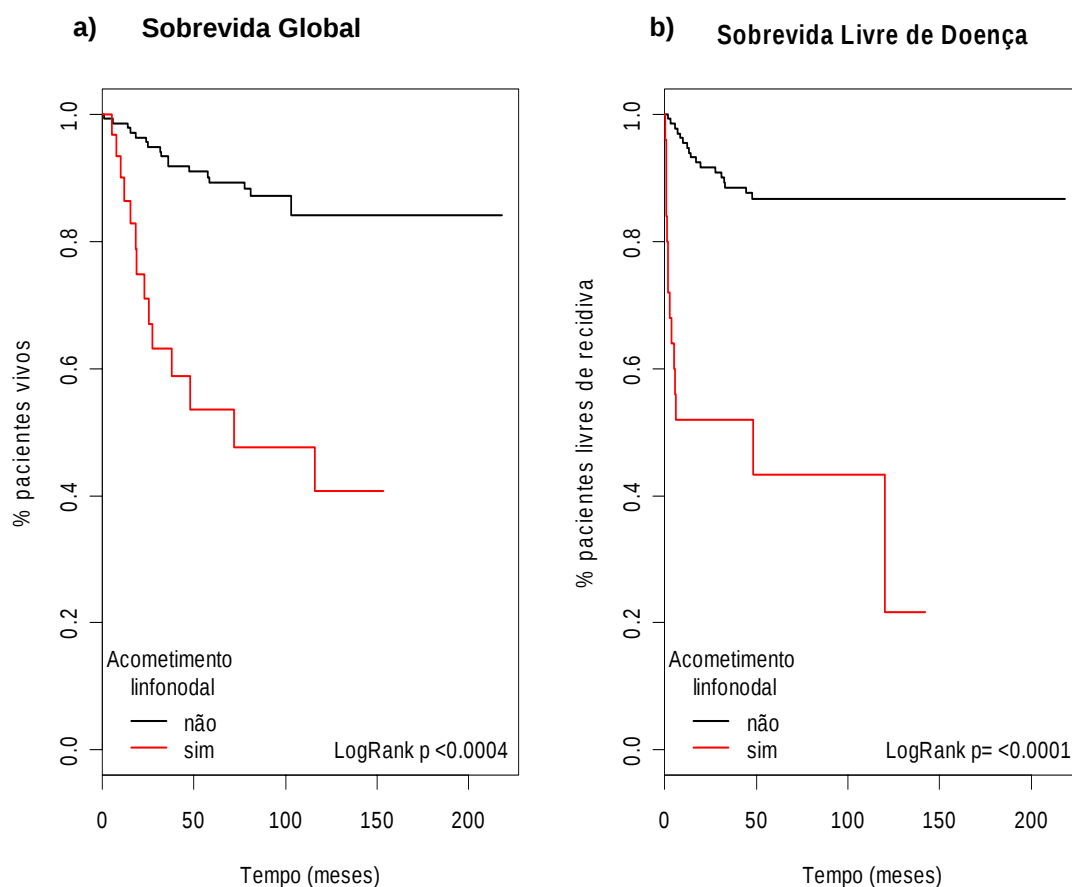
Legenda: **a)** Sobrevida Global com a porcentagem de pacientes vivos em função do tempo em meses de acordo com o estágio. **b)** Sobrevida Livre de Doença com a porcentagem de pacientes livres de recidiva em função do tempo em meses de acordo com o estágio. O gráfico demonstra resultado pior para estágio III.

Figura 14 – Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com estágio (no estágio I foram agrupados também os melanomas *in situ*). As curvas foram calculadas empregando-se o método de Kaplan-Meier e as comparações foram realizadas com o teste do log-rank considerando-se $p < 0,05$.



Legenda: **a)** Sobrevida Global com a porcentagem de pacientes vivos em função do tempo em meses de acordo com a espessura de Breslow. **b)** Sobrevida Livre de Doença com a porcentagem de pacientes livres de recidiva em função do tempo em meses de acordo com a espessura de Breslow. O gráfico demonstra sobrevidas inferiores para espessura > 2,0mm.

Figura 15 – Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com a espessura de Breslow. As curvas foram calculadas empregando-se o método de Kaplan-Meier e as comparações foram realizadas com o teste do log-rank considerando-se $p < 0,05$.



Legenda: **a)** Sobrevida Global com a porcentagem de pacientes vivos em função do tempo em meses de acordo com o acometimento linfonodal. **b)** Sobrevida Livre de Doença com a porcentagem de pacientes livres de recidiva em função do tempo em meses de acordo com o acometimento linfonodal. O gráfico demonstra resultado pior para presença de acometimento linfonodal.

Figura 16 – Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com o acometimento linfonodal. As curvas foram calculadas empregando-se o método de Kaplan-Meier e as comparações foram realizadas com o teste do log-rank considerando-se $p < 0,05$.

Na análise multivariada, apenas o Breslow e a expressão de PPARG permaneceram como variáveis independentemente associadas com sobrevida global. Da mesma forma, apenas estágio e a expressão de PPARG estiveram estatisticamente associados, de maneira independente, sobrevida livre de doença. Foram incluídos no modelo de análise multivariada a expressão de todos os marcadores, o estadiamento, o índice de Breslow e o acometimento linfonodal (Tabela 18).

Tabela 18 - Análise multivariada das variáveis clínico-patológicas sobre a sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD).

SG (n=68)					
Variável	Categoria	RR	IC (95%)		p
Breslow					
	<=2	1	-	-	
	>2	16,26	2,16	122,16	0,007
PPARG					
	Positivo	1	-	-	
	Negativo	2,32	0,95	5,63	0,063
SLD (n=72)					
Variável	Categoria	RR	IC (95%)		p
Estádio					
	in situ ou I	1	-	-	
	II ou III	10,84	2,96	39,69	0,0003
	IV	14,65	3,40	63,20	0,0003
PPARG					
	Positivo	1	-	-	
	Negativo	3,07	1,21	7,80	0,019

Foram incluídas no modelo as variáveis: expressão imunoistoquímica de TFE3, VEGFR1, FABP4, PPARG e IFI16, acometimento linfonodal, Breslow e estágio. Empregou-se método de regressão de Cox, mantendo-se no modelo as variáveis que atingiram um $p < 0,05$.

A inclusão dos casos com melanoma *in situ* pode ter afetado favoravelmente a sobrevida dos pacientes, bem como terem interferido nas associações observadas. Desta maneira, realizamos as mesmas análises descritas acima, excluindo-se os casos de melanoma *in situ*. Estes resultados estão demonstrados no ANEXO 3.

6 DISCUSSÃO

Não somente no Brasil, sobretudo na região sul, mas em todo o mundo, a incidência de melanoma vem aumentando significativamente, sendo o tumor de pele mais agressivo (DIMATOS et al. 2009). Novos estudos vêm sendo realizados para uma melhor compreensão do comportamento biológico do melanoma.

Especificamente nesta dissertação, melanomas do tipo extensivo superficial e lentiginoso acral foram selecionados como objeto de estudo.

O tipo extensivo superficial, normalmente está associado a tumores finos. Numa série contendo 307 indivíduos com melanoma extensivo superficial, houve uma distribuição quase equitativa entre os sexos (48% de homens e 52% de mulheres), sendo a mediana de idade de 51 anos. O Breslow mediano nesta amostra, para este subtipo de melanoma, foi de 1,1mm. Estes tumores parecem ter um crescimento mais indolente, em vista do maior tempo entre a primeira vez que o paciente a percebe e procura ajuda médica para diagnóstico (9 meses x 5 meses para melanoma nodular) (WACHYKA et al. 2008).

Numa série de 1413 pacientes portadores de melanoma lentiginoso acral, levantada no banco de dados do SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*) de 1986 a 2005, Bradford et al. (2009) observaram uma frequência mais alta deste subtipo entre afro-americanos, com acometimento preferencial das extremidades inferiores. A sobrevida melanoma-específica em 5 e 10 anos observada foi inferior (80,3% e 67,5%, respectivamente) para o subgrupo de indivíduos com melanoma lentiginoso acral quando comparadas a de portadores de melanoma como um todo (91,3% e 87,5%, respectivamente, $p < 0,001$) (BRADFORD et al. 2009).

Os resultados apresentados foram obtidos, basicamente, pela associação dos dados clínico-patológicos com a expressão dos marcadores VEGFR1, PPARG, FABP4, IMP3, TFE3 e IFI16 nas amostras de tumores através da técnica de imunoistoquímica em amostras parafinizadas. Este é um estudo retrospectivo e empregou TMA já previamente disponível, realizando-se a atualização do banco de dados preexistente. A maior dificuldade encontrada foi atualizar as informações clínicas sobre os pacientes das amostras de melanoma do tipo lentiginoso acral provenientes da Bolívia.

Neste estudo, observamos uma maior proporção de acometimento de pacientes do gênero feminino (60% dos casos) (AGUIAR et al. 2009; AVILÉS et al. 2006; MARGHOOB et al. 2000; CRIADO et al. 1999; KALADY et al. 2003; FERRARI et al. 2008), com uma média de idade de 55,24 anos (SORTINO-RACHOU et al. 2008, DIMATOS et al. 2009), e predomínio de indivíduos da cor branca (86,4%) (DIMATOS et al. 2009; AGUIAR et al. 2009).

As localizações mais frequentes das lesões foram tronco e pés. O segundo lugar ocupado pelos pés como topografia mais comum de acometimento nesta amostra, deveu-se, provavelmente, ao fato de termos agrupado aqui casos de melanoma lentiginoso acral, que notoriamente têm predileção por esta topografia (BRADFORD et al. 2009).

Os dados acima são compatíveis com os encontrados na literatura, inclusive com dados encontrados na própria população brasileira. Bonfá et al. (2011) levantaram 328 pacientes portadores de melanoma tratados no Complexo Hospitalar da Santa Casa de Porto Alegre - RS, de 2000 a 2005, e observaram uma maior prevalência entre indivíduos do sexo feminino (57%), com uma média de idade de

55,63 anos. O sítio de acometimento mais frequente foi o tronco (38,11%) (BONFÁ et al. 2011).

Houve ainda um predomínio de tumores na fase de crescimento vertical, totalizando 91,8 % (157 pacientes) da amostra. O Breslow médio foi de 3,47 mm (3,72), e mediana de 2,20 mm. A média de tamanho transversal da lesão de 2,26 cm (1,69) e mediana de 1,80 cm. Em relação ao nível de Clark, 41% dos tumores se encontravam no nível III.

A ausência de ulceração (67,8%) e de regressão (85,9%) foi observada na maioria dos casos. Dados semelhantes foram encontrados na mostra do Rio Grande do Sul, sendo que 75,6% não apresentavam ulceração e 79,8% não apresentavam regressão (BONFÁ et al. 2011).

O índice mitótico se manteve menor que 10 mitoses/campo em 87,6% dos casos, compatível com dados encontrados em outras séries (BATTISTI et al. 2009; DIMATOS et al. 2009; WEBER et al. 2007; BONFÁ et al. 2011).

A avaliação dos dados apresentados acima indica tratar-se de uma amostra que reproduz o comportamento biológico habitual encontrado na literatura para melanomas nos diversos estádios.

Durante a análise imunoistoquímica, encontramos algumas dificuldades relacionadas à forte pigmentação das células pela melanina em alguns casos e em outras situações o esgotamento de material biológico em determinados "spots" nos cortes avaliados, tornando o caso em questão não avaliável.

Para tentar contornar o problema da pigmentação pela melanina, primeiramente as lâminas foram coradas com fosfatase alcalina e "Fast Red" (cor vermelha), entretanto observou-se muita inespecificidade na marcação.

Posteriormente, as reações foram repetidas com todos os anticorpos, corando-se as lâminas com peroxidase e DAB (cor castanha), conseguindo-se assim uma marcação mais específica e com menos "background". Não conseguimos avaliar a expressão de IMP3 nas nossas amostras devido ao fato de não termos conseguido padronizar a reação imunoistoquímica para o anticorpo que tínhamos disponível contra o mesmo.

IFI16, um dos marcadores utilizados neste estudo, apresentou positividade relativamente baixa (54%) em relação aos demais marcadores.

A expressão de IFI16 esteve associada a estádios iniciais (*in situ* ou I) e com regressão, bem como com ausência de ulceração. Percebemos também uma associação com Breslow $\leq 2,0$ mm. Setenta e dois por cento das amostras de melanoma do tipo extensivo superficial apresentaram marcação para esta proteína, sugerindo uma possível associação deste subtipo de melanoma com a expressão de IFI16, mas que precisaria ser confirmada numa série maior, contendo os demais subtipos.

A expressão de IFI16, em nossa amostra, não apresentou associação com as outras variáveis estudadas (localização, crescimento, Clark, índice mitótico e acometimento linfonodal).

O controle do ciclo celular e apoptose são de fundamental importância na transformação maligna das células e determinação da agressividade de diversas neoplasias. Estudos sugerem que a perda de *IFI16* resulta na desregulação da apoptose mediada por p53, podendo levar ao desenvolvimento de câncer (FUJIUCHI et al. 2004).

Foi observada uma menor expressão de IFI16 em tumores de mama quando comparados a tecido glandular mamário normal. Este modelo é reforçado pela

observação de maior taxa de apoptose induzida por danos ao DNA em células que superexpressam IFI16, enquanto que o "knockdown" desta proteína diminui a apoptose em resposta a dano ao DNA mediado por radiação ionizante. Concomitante, IFI16 aumenta apoptose somente quando co-expressa em células deficientes em P53, bem como se observa um aumento de expressão de genes regulados por P53 em células MCF7 que expressam IFI16 (FUJIUCHI et al. 2004).

Da mesma forma, osteossarcomas também apresentaram uma expressão mais baixa de *IFI16*, quando comparados a tecido ósseo normal. A superexpressão de *IFI16* em células de linhagens de osteossarcoma e condrossarcoma promoveu inibição de crescimento e inibição de formação de colônias, bem como promoveu o desenvolvimento de senescência celular, fenômenos estes que puderam ser revertidos com a introdução de um si-RNA contra *IFI16* (ZHANG et al. 2007).

Clarke et al. (2010) induziram a expressão nuclear de uma proteína de fusão entre o receptor de estrógeno (ER) e IFI16, e observaram indução de senescência e inibição da atividade da telomerase nestas células, contribuindo para inibição de proliferação celular nas mesmas. Além disso, estes fenômenos parecem ser independentes da ativação de P53 (CLARKE et al. 2010).

Em um modelo onde células da linhagem HNO136 de carcinoma de cabeça e pescoço foram inoculadas em camundongos, a indução de expressão de IFI16 foi capaz de diminuir a tumorigênese da linhagem, reduzir a vascularização tumoral, aumentar as áreas de necrose intratumoral e promover um aumento do infiltrado inflamatório, principalmente por macrófagos (MAZIBRADA et al. 2010).

Paralelamente, IFI16 parece inibir a ativação da caspase-1 mediada pelos inflamossomas AIM2 e NRLP3 em resposta aos interferon do tipo I que sabidamente tem atividade anti-inflamatória (VEERANKI et al. 2011).

Desta maneira, IFI16 pode ser importante para inibir a proliferação celular e induzir apoptose, e provavelmente é perdido a medida que o melanoma progride para estádios mais avançados, daí a associação com tumores em estádios mais iniciais e com Breslow menor na nossa amostra. Entretanto, em vista do papel contraditório de IFI16 na resposta inflamatória dependendo do cenário biológico em questão, fica difícil estabelecer uma hipótese mais sólida para a associação observada entre a expressão de IFI16, a ausência de ulceração e presença de regressão.

Há associação da expressão de IFI16 com a expressão de TFE3 e PPARG. Não encontramos nenhuma descrição de associação entre expressão de TFE3 e IFI16, contudo Xiao et al. (2010) observaram que a superexpressão do RNAm para o gene *p204*, da mesma família do gene que codifica IFI16, em pré-adipócitos promoveu o aumento da expressão do RNAm do gene *PPARG*. Além disso, a diminuição da expressão de *p204* também esteve associada com uma menor atividade transcripcional de *PPARG*. Assim podemos hipotetizar que na nossa amostra o aumento de expressão de IFI16 também esteja associado com uma maior expressão de *PPARG* (XIAO et al. 2010).

A FABP4 apresentou marcação citoplasmática, como esperado, e esteve expressa na maioria dos casos (80%). Sua expressão esteve associada a estádios iniciais, Breslow $\leq 2,0$ mm mm e com o tipo extensivo superficial.

Proteína conhecida como transportador de lipídios nos adipócitos, a FABP4 da família dos FABPs, é capaz de ligar os ácidos graxos de cadeia longa e o ácido

retinóico a seus receptores cognatos no núcleo. Embora a função biológica exata das FABPs não seja totalmente conhecida, têm sido implicadas em vários processos celulares, incluindo captação e tráfico intracelular de mediadores lipídicos (ELMASRI et al. 2009).

FABP4 está envolvido nas respostas metabólicas (metabolismo lipídico e glicídico) e imunológicas (inflamação). Embora os papéis biológicos para FABP4 ainda não sejam totalmente conhecidos. Sabe-se que o nível de FABP4 é regulado pela composição da dieta, por hormônios e por fatores de transcrição como o PPARG (VURAL et al. 2007; CABRÉ et al 2010).

Estudos recentes sugerem que FABP4 é amplamente expresso, não somente no tecido adiposo, como em tumores de bexiga, estando associado com a atividade angiogênica mediada por VEGF/VEGFR2, com o controle da atividade do PPARG. (LIU et al. 2008; BIRON-SHENTAL et al. 2007; BOITEUX et al. 2009).

Boiteux et al. (2009) observaram uma correlação negativa entre níveis crescentes de expressão do transcrito de *FABP4* e aumento do estágio em carcinomas de células transicionais de bexiga. Também foi vista uma correlação negativa entre a expressão de FABP4 e o grau histológico (BOITEUX et al. 2009). Na nossa amostra, observamos uma associação da expressão de FABP4 com estádios mais iniciais semelhantemente ao verificado nos para câncer de bexiga.

Mais recentemente, foi descrito uma associação da expressão de FABP4 avaliada por imunofluorescência e aumento do grau histológico em tumores gliais do sistema nervoso central (CATALTEPE et al. 2011), isso juntamente com os dados mostrando que FABP4 é indispensável para promover proliferação de células endoteliais mediada por VEGFR2 (ELMASRI et al. 2009). Esse dado, contudo, entra

em contradição com os dados descritos acima, assim como, com a associação observada no nosso estudo entre a expressão desta proteína e um Breslow mais baixo, sugerindo que esta proteína pode ter funções distintas e contexto-dependentes.

A expressão de FABP4 esteve associada com a expressão de VEGFR1, da mesma maneira a expressão de VEGFR1 esteve associada com a expressão de PPARG. Agonistas de PPARG podem aumentar a expressão tanto de VEGFR2, quanto de VEGFR1. Tal fenômeno foi observado ao se tratar miofibroblastos de camundongo *in vitro* com troglitazona e 15-deoxi-prostaglandina. Observou-se também que a exposição a estes agonistas aumentou a expressão de VEGF no mesmo modelo (CHINTALGATTU et al. 2007). Como FABP4 é importante para o transporte de ligantes de PPARG do citoplasma para o núcleo, podemos hipotetizar que seria coerente a observação da elevação da expressão destes marcadores em concerto.

PPARG foi o segundo marcador com maior expressão nos tumores avaliados neste estudo, com positividade em 75% das amostras, principalmente entre as amostras de melanoma do tipo extensivo superficial. Associou-se com um nível de Clark $\leq$ III, sem associação com as demais variáveis.

A família PPAR, ativada por ácidos graxos, é expressa principalmente no tecido adiposo e em níveis mais baixos no músculo, fígado, coração, cólon e células do sistema imunológico (VURAL et al. 2007).

PPARs foram descobertos por regular o metabolismo dos lipídios, da glicose e dos aminoácidos, mas, recentemente, tem havido um número crescente de trabalhos revelando que, além do seu papel bem definido na diferenciação de células mesenquimais para adipócitos, pode funcionar como modulador da resposta

inflamatória e de potenciais agentes antitumorais, inclusive inibindo o crescimento de células de melanoma através da indução de parada do ciclo celular (GRABACKA et al. 2008; MOSSNER et al. 2007; PETERS et al. 2012).

A expressão de PPARG esteve inversamente associada com o grau histológico, tamanho do tumor, acometimento linfonodal, Ki67 e estadiamento TNM numa amostra de 70 casos de câncer de mama TNM (JIANG et al. 2009).

Em carcinomas uroteliais da bexiga, também foi observada uma correlação inversa da expressão de PPARG com o grau histológico, marcação para Ki67 e o estadiamento (MYLONA et al. 2009).

Logo, a associação aqui observada com a profundidade das lesões ($\text{Clark} \leq 3$) é compatível com os dados publicados, mostrando que o PPARG tende a estar mais expresso em associação com características marcadoras de menor agressividade tumoral. Podemos, inclusive, hipotetizar que existe perda de expressão desta proteína a medida que a neoplasia progride.

O tratamento do melanoma metastático encontra muitas dificuldades na melhora das taxas de cura devido ao insucesso das estratégias até recentemente empregadas. Isso se deve a resistência das células de melanoma metastático aos agentes citotóxicos convencionais. O PPARG tem demonstrado poder ser um possível alvo no tratamento do melanoma maligno, pois seus agonistas têm demonstrado um efeito antiproliferativo nas células deste tipo de tumor com uma eficácia superior a de outros agentes (EASTHAM et al. 2008; FREUDLSPERGER et al. 2010).

Marcador de menor expressão dentre as amostras analisadas neste estudo, a expressão de TFE3, da família MITF, foi mais frequente nos tumores que

apresentavam regressão e nos melanomas extensivos superficiais. Outrossim, verificamos uma associação entre a expressão de TFE3 e a expressão de PPARG.

MITF é um fator de transcrição que desempenha um papel essencial para o desenvolvimento e a manutenção de células precursoras dos melanócitos, os melanoblastos (originários da crista neural, que migram ao longo das vias característica para vários destinos, como derme e epiderme, orelha interna, coróide do olho e folículos pilosos). Controla também a expressão de genes necessários para a síntese de melanina. Além disso, MITF foi descrito como estando envolvido na regulação do ciclo celular e desempenhando funções importantes na auto-renovação e manutenção de células-tronco dos melanócitos, e parece ser fundamental para a sobrevivência dos melanócitos malignos (SCHEPSKY et al. 2006; STRUB et al. 2011). Esta constatação se deve a observação de que a proliferação e a migração de melanoblastos durante o desenvolvimento embrionário ser muito semelhante à proliferação e padrões de metástase de células de melanoma e melanócitos (SCHEPSKY et al. 2006).

Considerando-se que a expressão correta dos numerosos fatores de transcrição e moduladores, em uma localização precisa, determinam o tempo e um desenvolvimento embrionário de sucesso, a desregulação destes, frequentemente podem levar à transformação oncogênica.

Estes eventos são precedidos por um aumento inicial transitório da expressão do gene do fator de transcrição associado à microftalmia (MITF). Da mesma forma, a sinalização Wnt e β -catenina, que desempenha um papel essencial na formação da crista neural embrionária, oferecem vantagens proliferativas e de sobrevivência em

células de melanoma em parte através da indução de MITF (GRABACKA et al. 2008).

Por serem fundamentais durante o desenvolvimento do melanócito, é interessante especular que MITF, Wnt e β -catenina possam desempenhar um papel central no comportamento de células de melanoma, pois a expressão do MITF é retida na grande maioria dos melanomas humanos, incluindo os tumores em que muitos outros marcadores de diferenciação, tais como os de pigmentação, são perdidos (WIDLUND et al. 2002; SCHEPSKY et al. 2006).

Por sugerirem um papel do MITF na sobrevivência celular, e na proliferação dos melanócitos antes e durante a migração de células da crista neural, coletivamente, esses estudos demonstram que MITF, além de seu papel em vias de diferenciação, tais como pigmentação, pode servir um importante papel na proliferação e sobrevivência dos melanócitos em desenvolvimento. A retenção de expressão MITF na grande maioria dos melanomas primários humanos, incluindo tumores pigmentados, é consistente com essa possibilidade e também levou ao uso generalizado de MITF como uma ferramenta diagnóstica nesta malignidade (WIDLUND et al. 2002). Embora pouco se saiba sobre como MITF regula estes processos, uma possibilidade é que MITF interaja com outros reguladores importantes nestes processos (SCHEPSKY et al. 2006).

MITF pode interagir diretamente com a β -catenina, regulador importante do crescimento das células de melanoma, sendo o mediador-chave da via de sinalização Wnt canônica, desempenhando um papel crítico no desenvolvimento de melanócitos e estar intimamente envolvido no desencadeamento da proliferação de células-tronco dos melanócitos. Significativamente, a ativação constitutiva desta via é uma

característica de um grande número de cânceres, incluindo o melanoma maligno. Com MITF como alvo crítico, a interrupção da via Wnt canônica anula o crescimento de células de melanoma, e a superexpressão constitutiva da MITF resgata a supressão do crescimento (reduz a expressão do gene β -catenina). Por outro lado, a superexpressão de β -catenina aumenta MITF de maneira dependente da expressão gênica, ou seja, MITF promove a proliferação de células de melanoma, enquanto supressão sustentada de expressão MITF leva à senescência (WIDLUND et al. 2002; SCHEPSKY et al. 2006; STRUB et al. 2011).

Estas observações estabelecem um papel crítico na sinalização para Wnt, β -catenina e MITF na diferenciação dos melanócitos, no crescimento celular e na sobrevivência de melanoma humano (WIDLUND et al. 2002; SCHEPSKY et al. 2006).

TFE3 é um dos membros da família do fator de transcrição associado à microftalmia que inclui ainda TFEB, TFEC e o MITF, fator de transcrição homólogo ao TFE3 (MITF/TFE3). O ganho de função destes genes tem sido associado com diferentes grupos de tumores, incluindo melanomas malignos (sendo MITF um regulador chave nos melanócitos em desenvolvimento), sarcoma de células claras, sarcoma alveolar de partes moles e um subconjunto específico de carcinoma de células renais, caracterizados por translocações cromossômicas envolvendo o cromossomo Xp11.2 resultando em fusão (e ativação) do gene *TFE3* (ARGANI et al. 2003; TRUONG e SHEN 2011;).

A expressão destas proteínas pode ser desregulada nesses tumores sendo detectadas mediante reação de imunoistoquímica com positividade nuclear das células tumorais (MACHER-GOEPPINGER et al. 2011; TRUONG e SHEN 2011).

MACHER-GOEPPINGER et al. (2011), avaliaram a expressão imunoistoquímica de TFE3 em carcinomas renais de células claras e, na análise univariada, mostraram sobrevida câncer específica significativamente inferior para quem expressava TFE3. Para tumores sem translocação de TFE3, a expressão desta proteína, seja citoplasmática ou nuclear, esteve fortemente associada ao grau de malignidade, com a extensão do tumor, bem como com metástases à distância em regiões linfonodais. Na análise multivariada, esta permaneceu como uma variável independente, onde os resultados confirmaram a expressão de TFE3 como um marcador de prognóstico desfavorável em pacientes com carcinoma renal de células claras com ou sem metástases no momento do diagnóstico.

DICKSON et al. (2011) encontraram o TFE3 expresso em 10 casos de 16 melanomas metastáticos avaliados em sua série, embora com uma intensidade de marcação inferior àquela vista em sarcomas alveolares de partes moles, por exemplo.

No momento, como não está claro o papel desta proteína em melanomas, muito menos o mecanismo exato pelo qual a regressão ocorre, fica difícil se teorizar a respeito desta associação.

A expressão de VEGFR1 esteve associada significativamente com Breslow $\leq 2,0$ mm e com estadiamento inicial (*in situ* e estágio I).

Durante a última década, novos inibidores da angiogênese foram identificados, e vários têm demonstrado eficácia contra o crescimento do tumor. No entanto, a maioria dos tumores ainda é resistente a esses agentes (VARTANIAN et al. 2011).

Uma etapa fundamental na progressão do melanoma é a transição do tumor primário a partir de uma fase de crescimento radial (RGP) para uma fase de

crescimento vertical (VGP) (ROBERTSON et al. 1996). Este último exige a atividade angiogênica, que contribua para a disseminação de células tumorais metastáticas. Entre os fatores angiogênicos liberados por células de melanoma está incluso o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (RUFFINI et al. 2011).

Recente trabalho de RUFFINI et al. (2011), demonstrou uma relação entre a expressão de sVEGFR1 com a progressão do melanoma humano sugerindo que a baixa expressão de sVEGFR1, especificamente ocorrendo em metástases cutâneas com relação a melanomas primários ou metástases linfáticas, possa contribuir para a capacidade de invasão do melanoma de pele. De acordo com os resultados obtidos observou-se que sVEGFR1 é expresso, embora em diferentes níveis, em mais de 90% das espécimes de melanoma primário. Além disso, uma alta porcentagem das metástases cutâneas analisadas mostraram uma diminuição na expressão de sVEGFR1 em relação aos seus correspondentes tumores primários.

A progressão da lesão primária para uma metástase cutânea pode ser, assim, favorecida pela baixa expressão de sVEGFR1, o que contribuiria para aumentar o VEGFA livre e disponibilizar PlGF. A expressão de sVEGFR1 seria regulada em células de melanoma e este polipeptídeo pode desempenhar um papel duplo durante as fases iniciais da progressão do melanoma: como um polipeptídeo solúvel que controla a invasão das células tumorais e como um componente da matriz extracelular, promovendo a adesão e migração das células endoteliais e tumorais (RUFFINI et al. 2011).

VEGFR1 parece ser importante para manutenção do fenótipo de mimetismo vascular, e a inibição da expressão de VEGFR1 empregando si-RNA em linhagens de melanoma com fenótipo de célula-tronco tumoral inibe a proliferação celular, bem

como a deposição de laminina na matriz, um importante mitógeno para melanoma (FRANK et al. 2011).

RODA et al. (2011), entretanto, demonstraram que a inibição da expressão de sVEGFR1 num modelo animal de melanoma esteve associada com menor crescimento tumoral e diminuição da angiogênese.

Depreende-se do exposto, que VEGFR1 apresenta atividades antagônicas, podendo promover ou dificultar o crescimento tumoral, dependendo do contexto biológico e das interações do tumor com seu microambiente. Os nossos resultados parecem sugerir que no contexto ora avaliado, a expressão de VEGFR1 está associada com lesões mais iniciais (ou menos agressivas?) e, portanto, pode estar agindo como um modulador negativo da angiogênese.

A expressão de FABP4, IFI16, TFE3, VEGFR1, PPARG, aparentemente não influenciou de maneira significativa nem a sobrevida global, nem a sobrevida livre de doença dos pacientes, entretanto isto pode se dever ao pequeno número de pacientes avaliáveis para cada marcador nesta amostra. Outro dado comum a todos os marcadores foi a expressão positiva nos estádios iniciais, principalmente no melanoma do tipo extensivo superficial. Entretanto, isso pode ser um fator de confusão, uma vez que este subtipo tende a se apresentar em estádios mais iniciais.

Sobrevida global e sobrevida livre de doença estão classicamente associadas com o nível de Clark IV e V ($p < 0,0001$), a presença de ulceração ($p = 0,001$); com estádios mais avançados ($p = 0,008$) e ao tipo acral lentiginoso ($p < 0,0001$) (DIMATOS et al. 2009).

Aspectos histológicos da espessura do tumor primário, índice mitótico e ulceração são características importantes para o prognóstico, estadiamento e sobrevida no melanoma.

A espessura do tumor e a ulceração são, consistentemente, os mais poderosos fatores prognósticos independentemente da localização cutânea do melanoma. A espessura aumentada do tumor está associada com piora na sobrevida (HOMSI et al 2005).

Os dados observados neste estudo foram compatíveis com os publicados na literatura, mostrando que as taxas de sobrevida de pacientes com melanoma ulcerado são proporcionalmente menores do que daqueles pacientes sem ulceração (BALCH et al. 2009). Sendo a ulceração o segundo fator prognóstico de maior importância nos melanomas localizados (estádios I e II) (BALCH et al. 2001).

O estadiamento corresponde a uma cuidadosa avaliação da espessura e extensão do tumor, da invasão da pele e se as células de melanoma invadiram os gânglios linfáticos vizinhos ou outras partes do corpo.

Melanomas em estágio III foi a característica clínica de pior prognóstico do tumor primário, demonstrada na análise estatística dos nossos dados. No estágio III as células de melanoma propagam-se para os tecidos circundantes, podendo até se observar a presença de micrometástase nos linfonodos (BALCH et al. 2001, 2009).

O nível de Clark não é mais considerado um critério tão importante como era anteriormente, uma vez que não é um fator prognóstico independente, como, por exemplo, o índice de Breslow (OWEN et al. 2001; BALCH et al. 2009). Descrito por diversos autores, a sobrevida é inversamente proporcional ao nível de invasão

neoplásica segundo o nível de Clark (MORTON et al. 1993; GARBE et al. 2000; BARNHILL et al. 2005; CALY 2010).

A taxa de sobrevida em 5 anos é de 95% para melanomas em nível de Clark II, entre 80% e 85% para melanomas em nível de Clark III e IV e 55% para melanomas em nível de Clark V (HOMSI et al. 2005).

O nível de Clark foi demonstrado ser mais preditivo de sobrevida em melanomas finos ($<1,0$ mm). Para os tumores com espessura maior do que 1 mm, o nível de Clark é menos preditivo e tem sua utilidade limitada (HOMSI et al. 2005).

O melanoma do tipo acral lentiginoso é a lesão de maior agressividade dentre os outros tipos de melanoma, talvez pela dificuldade no diagnóstico precoce das lesões, por causa da sua localização (palma das mãos ou planta dos pés) ou por se apresentarem em estádios mais avançados ao diagnóstico (STALKUP et al. 2002; PHAN et al. 2007). Explicando assim, sua associação com níveis baixos de sobrevida entre os pacientes diagnosticados com este tipo de lesão.

Na análise multivariada, apenas o índice de Breslow e a expressão de PPARG permaneceram como variáveis independentemente associadas com sobrevida global em nossa coorte.

O índice de Breslow continua a ser o fator prognóstico de maior importância no melanoma (AZZOLA et al. 2003; BUSAN 2004; NAGORE et al. 2005; BARNHILL et al. 2005; ELDER et al. 2005; BARNHILL et al. 2006; DIMATOS et al. 2009; AGUIAR et al. 2009; EDGE et al. 2010).

Medida em milímetros, ela determina a profundidade de infiltração do tumor a partir da camada espinhosa da epiderme (BRESLOW 1970). Os indivíduos que apresentarem espessura de Breslow menor que 0,76 mm podem atingir uma

sobrevida de 95% em cinco anos. Entretanto, o aumento desta espessura está associado com uma probabilidade mais alta de desenvolvimento de metástases linfonodais e disseminação hematogênica (DIMATOS et al. 2009).

Em relação a sobrevida livre de doença, apenas estágio e a expressão de PPARG estiveram estatisticamente associados de maneira independente. Foram incluídos no modelo de análise multivariada a expressão de todos os marcadores, o estadiamento, o índice de Breslow e o acometimento linfonodal.

Quanto ao papel do PPARG tanto na sobrevida global quanto na sobrevida livre de doença, pode ser explicado pela sua função anticarcinogênica, relacionado a um bom prognóstico. Tal associação também foi observada para outros tipos tumorais.

A expressão de PPARG esteve associada com uma sobrevida global prolongada em câncer de mama (JIANG et al. 2009).

Numa amostra de 470 indivíduos com câncer colorretal, 22% apresentaram expressão de PPARG. A expressão de PPARG esteve associada a uma maior sobrevida global e maior sobrevida câncer específica, independente de outras variáveis clínico-patológicas (OGINO et al. 2009).

Resultados semelhantes foram obtidos em carcinomas uroteliais de bexiga. MYLONA et al. (2009) avaliaram a expressão imunoistoquímica de PPARG em 117 amostras de carcinoma urotelial de bexiga e verificaram que esta se correlacionava com uma maior sobrevida global (MYLONA et al. 2009).

Parte das análises estatísticas relacionadas à expressão das proteínas e as curvas de sobrevida global e livre de doença foram prejudicadas pelo número de pacientes que muitas vezes não conferiram poder estatístico para que a amostra

mostrasse valores estatisticamente significativos. Entretanto, a separação precoce das curvas de sobrevida em função da expressão de alguns destes marcadores sugere que estes de fato podem estar influenciando o comportamento e evolução clínica destes pacientes.

Assim sendo, esperamos que estudos futuros, com maior amostragem, possam permitir melhor avaliação destes dados, determinando se de fato estes fatores influenciam a sobrevida de pacientes com estes dois subtipos de melanoma. Para isso, pretendemos resgatar os blocos correspondentes aos "spots" não avaliáveis no nosso TMA e, se necessário, realizaremos o levantamento de uma nova amostra contendo novos casos a fim de complementar a amostra atual.

7 CONCLUSÃO

1. Correlacionamos a imunoexpressão de VEGFR1, PPARG, FABP4, TFE3 e IFI16 com os dados clínicos e patológicos em melanomas cutâneos extensivos superficiais e lentiginosos acraís.
2. Não foi possível avaliar a expressão de IMP3.
3. A expressão de IFI16 esteve associada com a expressão dos marcadores TFE3 e PPARG; FABP4 apresentou associação significativa com o marcador VEGFR1; a expressão de TFE3 apresentou associação com a expressão do marcador PPARG, e a expressão de VEGFR1 esteve associada com a expressão de PPARG.
4. Nenhum dos marcadores estudados se correlacionou com sobrevida global ou livre de doença na análise univariada.
5. Na análise multivariada, o Breslow e a expressão de PPARG estiveram associados de forma independente com a sobrevida global, enquanto o estágio e a expressão de PPARG estiveram associados de forma independente com sobrevida livre de doença.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O estudo é uma análise retrospectiva e como tal apresenta vários vieses de registro que podem impactar negativamente os resultados obtidos.

Verificamos um número elevado de casos não avaliáveis no TMA por perda

de material nos "spots", o que com certeza afetou o poder estatístico de algumas análises. Tentaremos repor os casos não-avaliáveis em outro TMA.

A amostra incluiu um pequeno número de melanomas *in situ*, o que pode ter influenciado os resultados, principalmente relacionados à sobrevida. Refaremos a análise removendo este grupo de indivíduos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar LFS, Almeida MWR, Nakamura F, Prado LFAM, Lyra TS, Ramos CDS. Análise do comportamento histopatológico do melanoma fundamental para uma boa prática na cirurgia plástica. **Rev Bras Cir Plast** 2009; 24:152-7.

Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. **Crit Rev Oncol Hematol** 2008; 66:1-9.

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

Argani P, Lal P, Hutchinson B. et al. Aberrant nuclear immunoreactivity for TFE3 in neoplasms with TFE3 gene fusions a sensitive and specific immunohistochemical assay. **Am J Surg Pathol** 2003; 27:750-61.

Argani P, Aulmann S, Karanjawala Z, Fraser RB, Ladanyi M, Rodriguez MM. Melanotic Xp11 translocation renal cancers: a distinctive neoplasm with overlapping features of PEComa, carcinoma, and melanoma. **Am J Surg Pathol** 2009; 33:609-19.

Avilés JA, Lázaro P, Lecona M. Epidemiology and survival of cutaneous melanoma in Spain: a report of 552 cases (1994-2003). **Rev Clin Esp** 2006; 206:319-25.

Ayers SD, Nedrow KL, Guillillan RE, et al. Continuous nucleocytoplasmic shuttling underlies transcriptional activation of PPAR γ by FABP4. **Biochemistry** 2007; 46:6744-6752.

Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF, et al. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. **Cancer** 2003; 97:1488-98.

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. **J Clin Oncol** 2001; 19:3622-34.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. **J Clin Oncol** 2009; 27:6199-206.

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

Barnhill RL, Fine JA, Roush GC, Berwick M. Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. **Cancer** 1996; 78:427-32.

Barnhill RL, Katzen J, Spatz A, Fine J, Berwick M. The importance of mitotic rate as a prognostic factor for localized cutaneous melanoma. **J Cutan Pathol** 2005; 32:268-73.

Battisti R, Nunes DH, Lebsa-Weber A, Schweitzer LC, Sgrott I. Avaliação do perfil epidemiológico e da mortalidade dos pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo primário no município de Florianópolis - SC, Brasil. **An Bras Dermatol** 2009; 84:335-42.

Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. **Nature** 2008; 454:470-7.

Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:401-10.

Biron-Shental T, Schaiff WT, Ratajczak CK, Bildirici I, Nelson DM, Sadovsky Y. Hypoxia regulates the expression of fatty acid-binding proteins in primary term human trophoblasts. **Am J Obstet Gynecol** 2007; 197:516.e1-6.

Boiteux G, Lascombe I, Roche E, et al. A-FABP, a candidate progression marker of human transitional cell carcinoma of the bladder, is differentially regulated by PPAR in urothelial cancer cells. **Int J Cancer** 2009; 124:1820-8.

Bonfá R, Bonamigo RR, Bonfá R, et al. Early diagnosis of cutaneous melanoma: an observation in southern Brazil. **An Bras Dermatol**. 2011; 86 (2): 215-21.

Botton T, Puissant A, Bahadoran P, et al. In vitro and in vivo anti-melanoma effects of ciglitazone. **J Invest Dermatol** 2009; 129:1208-18.

Bradford PT, Goldstein AM, McMaster ML, Tucker MA. Acral Lentiginous Melanoma: Incidence and Survival Patterns in the United States, 1986-2005. **Arch Dermatol** 2009; 145(4): 427–434.

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

Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput put in situ studies. **J Pathol** 2001; 195:72-9.

Busam KJ. The prognostic importance of tumor mitotic rate for patients with primary cutaneous melanoma. **Ann Surg Oncol** 2004; 11:360-1.

Cabré A, Lázaro I, Plana N, et al. Concentraciones plasmáticas de FABP4 y evolución del síndrome metabólico. **Clin Invest Arterioscl** 2010; 22:247-55.

Caly DN. **Melanoma acral-lentiginoso: análise de proteínas e genes do ciclo celular nas vias de sinalização p16/pRb, p53 e PTEN**. São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Camacho LH, Antonia S, Sosman J, et al. Phase I/II trial of tremelimumab in patients with metastatic melanoma. **J Clin Oncol** 2009; 27:1075-81.

Cataltepe O, Arikan MC, Ghelfi E, et al. Fatty Acid Binding Protein 4 is Expressed in Distinct Endothelial and Non-endothelial Cell Populations in Glioblastoma. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2011; 1365-2990.

Chang W, Huang HY, Sung MT. Melanotic Xp11 Translocation renal cancer a case with PSF-TFE3 gene fusion and up-regulation of melanogenetic transcripts. **Am J Surg Pathol** 2009; 33:1894-901.

Chena J, Panchanathana R, Choubeya D. Stimulation of T cells up-regulates expression of Ifi202, an interferon-inducible lupus susceptibility gene, through activation of JNK/c-Jun pathway. **Immunol Lett** 2008; 118:13-20.

Choubey D, Walter S, Geng Y, Xin H. Cytoplasmic localization of the interferon-inducible protein that is encoded by the AIM2 (absent in melanoma) gene from the 200-gene family. **FEBS Lett** 2000; 474:38-42.

Chu DH, Haake AR, Holbrook, Loomis CA. The structure and development of skin. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, et al., editors. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 6th ed. New York: Mcgraw-Hill; 2003. p.58-88.

Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. **J Clin Invest** 2005; 115:813-24.

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

Clarke CJ, Hii LL, Bolden JE, Johnstone RW. Inducible activation of IFI16 results in suppression of telomerase activity, growth suppression and induction of cellular senescence. **J Cell Biochem**. 2010; 109:103-12.

Criado PR, Vasconcellos C, Sittart JA, et al. Melanoma maligno cutâneo primário: estudo retrospectivo de 1963 a 1997 no Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo. **Rev Assoc Med Bras** 1999; 45:157-62.

Dickson BC, Brooks JS, Pasha TL, Zhang PJ. TFE3 expression in tumors of the microphthalmia-associated transcription factor (Mitf) family. **Int J Surg Pathol** 2011; 19:26-30.

Dimatos DC, Duarte FO, Machado RS, et al. Melanoma cutâneo no Brasil. **Arq Catar Med** 2009; 38:14-38.

Eastham L, Mills C, Niles R. PPAR alpha/gamma expression and activity in mouse and human melanocytes and melanoma cells. **Pharm Res** 2008; 25:1327-33.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti. **AJCC cancer staging manual**. 7^a ed. New York: Springer-Verlag, 2010. Melanoma of the skin; p.325-44.

Elder DE, Gimotty PA, Guerry D. Cutaneous melanoma: estimating survival and recurrence risk based on histopathologic features. **Dermatol Ther** 2005; 18:369-85.

Elmasri H, Karaaslan C, Teper Y, et al. Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. **FASEB J** 2009; 23:3865-73.

Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser capture microdissection. **Science** 1996; 274:998-1001.

Erkurt MA, Aydogdu I, Kuku I, et al. Nodular melanoma presenting with rapid progression and widespread metastases: a case report. **J Med Case Reports** 2009; 3:50.

Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM. Toward a molecular classification of melanoma. **J Clin Oncol** 2007; 25:1606-20.

Ferrari Júnior NM, Muller H, Ribeiro M, Maia M, Sanches Júnior JA. Cutaneous melanoma: descriptive epidemiological study. **Sao Paulo Med J** 2008; 126:41-7.

Fitzpatrick TB, EISEN AZ, WOLFF K, et al. **Dermatology in general medicine, Text Book, Fourth Edition, Vol I.** 1993; 137:1689 -1716.

Frank NY, Schatton T, Kim S et al. VEGFR-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth. **Cancer Res** 2011; 71:1474-85.

Freudlsperger C, Dahl A, Hoffmann J, Reinert S, Schumacher U. Mistletoe lectin-I augments antiproliferative effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone on human malignant melanoma cells. **Phytother Res** 2010; 24:1354-8.

Fujiuchi N, Aglipay JA, Ohtsuka T, et al. Requirement of IFI16 for the maximal activation of p53 induced by ionizing radiation. **J Biol Chem** 2004; 279:20339-44.

Gamonal A. **Dermatologia elementar: compêndio de dermatologia.** 2ª ed. Juiz de Fora: A. Gamonal, 2002.

Garbe C, McLeod GR, Buettner PG. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. **Cancer** 2000; 89:1269-78.

Goding CR. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. **Genes Dev** 2000; 14:1712-28.

Gould Rothberg BE, Berger AJ, Molinaro AM, et al. Melanoma prognostic model using tissue microarrays and genetic algorithms. **J Clin Oncol** 2009; 27:5772-80.

Grabacka M, Placha W, Urbanska K, Laidler P, Płonka PM, Reiss K. PPAR gamma regulates MITF and beta-catenin expression and promotes a differentiated phenotype in mouse melanoma S91. **Pigment Cell Melanoma Res** 2008; 21:388-96.

Goto Y, Matsuzaki Y, Kurihara S, et al. A New Melanoma Antigen Fatty Acid Binding Protein 7, involved in proliferation and invasion, is a potential target for immunotherapy and molecular target therapy. **Cancer Res.** 2006; (8):4443-9.

Haq R, Fisher DE. Biology and clinical relevance of the microphthalmia family of transcription factors in human cancer. **J Clin Oncol** 2011; 29:3474-82.

Harrist TJ, Schapiro B, Quinn TR, Clark WH. Pele. In: Rubin E, Farber JL, editores. **Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.1195-1253.

Hedblad MA, Mallbris L. Grenz ray treatment of lentigo maligna and early lentigo maligna melanoma. **J Am Acad Dermatol** 2011 Oct 24. [Epub ahead of print]

Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin Oncol** 2005; 23:1011-27.

Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, et al. A chemically defined culture of VEGFR2⁺ cells derived from embryonic stem cells reveals the role of VEGFR1 in tuning the threshold for VEGF in developing endothelial cells. **Blood** 2003; 101:2261-7.

Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, Seiki M, Noda T, Shibuya M. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. **Cancer Res** 2001; 61:1207-13.

Hoffmann NE, Sheinin Y, Lohse CM, et al. External validation of IMP3 expression as an independent prognostic marker for metastatic progression and death for patients with clear cell renal cell carcinoma. **Cancer** 2008; 112:1471-9.

Homsí J, Kashani-Sabet M, Messina JL, Daud A. Cutaneous melanoma: prognostic factors. **Cancer Control** 2005; 12:223-9.

Hospital A. C. Camargo, **Anatomia patológica**. Disponível em: <URL:<http://www.accamargo.org.br/servicos-especializados/anatomia-patologica/11>> [2011 apr 10].

Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005. **CA Cancer J Clin** 2005; 55:10-30.

Jiang Y, Zou L, Zhang C, et al. PPARgamma and Wnt/beta-Catenin pathway in human breast cancer: expression pattern, molecular interaction and clinical/prognostic correlations. **J Cancer Res Clin Oncol** 2009; 135:1551-9.

Jiang Z, Chu PG, Woda BA, et al. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. **Lancet Oncol** 2006; 7:556-64.

Jiang Z, Chu PG, Woda BA, et al. Combination of quantitative IMP3 and tumor stage: a new system to predict metastasis for patients with localized renal cell carcinomas. **Clin Cancer Res** 2008; 14:5579-84.

Kalady MF, White RR, Johnson JL, Tyler DS, Seigler HF. Thin melanomas: redictive lethal characteristics from a 30-year clinical experience. **Ann Surg** 2003; 238:528-35; discussion 535-7.

Kerber M, Reiss Y, Wickersheim A, et al. Flt-1 Signaling in Macrophages Promotes Glioma Growth In vivo. **Cancer Res** 2008; 68:7342-51.

Kielhorn E, Provost E, Olsen D, et al. Tissue microarray-based analysis shows phospho-catenin expression in malignant melanoma is associated with poor outcome. **Int J Cancer** 2003; 103:652-6.

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

Kim MKH, Mason JM, Li CM, et al. A pathologic link between Wilms tumor suppressor gene, WT1, and IFI16. **Neoplasia** 2008; 10:69-78.

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

Korabiowska M, Bauer H, Quentin T, Stachura J, Cordon-Cardo C, Brinck U. Application of new in situ hybridization probes for Ku70 and Ku80 in tissue microarrays of paraffin-embedded malignant melanomas: correlation with immunohistochemical analysis. **Hum Pathol** 2004; 35:210-6.

Langley RGB, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Clinical characteristics. In: Balch AM, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ, editors. **Cutaneous melanoma**. 3rd ed. Missouri: QMP; 1998. p.90.

Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. **Trends Mol Med** 2006; 12:406-14.

Liao B, Hu Y, Herrick DJ, Brewer G. The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. **J Biol Chem** 2005; 280:18517-24.

Li L, Xu H, Spaulding BO, et al. Expression of RNA-binding protein IMP3 (KOC) in benign urothelium and urothelial tumors. **Hum Pathol** 2008; 39:1205-11.

Lima VCC. **Análise do perfil de expressão gênica em melanomas cutâneos malignos murinos após tratamento sistêmico com o fator de necrose tumoral (TNF) associado ou não a melfalano (MEL).** São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Liu RZ, Li X, Godbout R. A novel fatty acid-binding protein (FABP) gene resulting from tandem gene duplication in mammals: transcription in rat retina and testis. **Genomics** 2008; 92:436-45.

Macher-Goeppinger S, Roth W, Wagener N. Molecular heterogeneity of TFE3 activation in renal cell carcinomas. **Mod Pathol** 2012; 25:308-15.

Marghoob AA, Koenig K, Bittencourt FV, Kopf AW, Bart RS. Breslow thickness and Clark level in melanoma: support for including level in pathology reports and in American Joint Committee on Cancer Staging. **Cancer** 2000; 88:589-95.

Masci P, Borden EC. Malignant melanoma: treatments emerging, but early detection is still key. **Cleve Clin J Med** 2002; 69:529, 533-4, 536-8.

Mazibrada J, De Andrea M, Rittà M, et al. In vivo growth inhibition of head and neck squamous cell carcinoma by the Interferon-inducible gene IFI16. **Cancer Lett** 2010; 287:33-43.

Menendez D, Krysiak O, Inga A, Krysiak B, Resnick MA, Schonfelder G. A SNP in the flt-1 promoter integrates the VEGF system into the p53 transcriptional network. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2006; 103:1406-11.

Mentrikoski MJ, Ma L, Pryor JG, et al. Diagnostic utility of IMP3 in segregating metastatic melanoma from benign nevi in lymph nodes. **Mod Pathol** 2009; 22:1582-7.

Mervic L. Time course and pattern of metastasis of cutaneous melanoma differ between men and women. **PLoS One** 2012; 7:1-10.

Mylona E, Giannopoulou I, Diamantopoulou K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in urothelial carcinomas of the bladder: association with differentiation, proliferation and clinical outcome. **Eur J Surg Oncol** 2009; 35:197-201.

Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schnierlich H, et al. High Affinity VEGF binding and developmental expression suggest flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. **Cell** 1993; 72:835-846.

Min W, Ghosh S, Lengyel P. The interferon-inducible p202 protein as a modulator of transcription: inhibition of NF-kappa B, c-Fos, and c-Jun activities. **Mol Cell Biol** 1996; 16:359-68.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas/2010 incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Mossner R, Meyer P, Jankowski F, et al. Variations in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene and melanoma risk. **Cancer Lett** 2007; 246:218-23.

Morton DL, Davtyan DG, Wanek LA, Foshag LJ, Cochran AJ. Multivariate analysis of the relationship between survival and the microstage of primary melanoma by Clark level and Breslow thickness. **Cancer** 1993; 71:3737-43.

Nagore E, Oliver V, Botella-Estrada R, Moreno-Picot S, Insa A, Fortea JM. Prognostic factors in localized invasive cutaneous melanoma: high value of mitotic rate, vascular invasion and microscopic satellitosis. **Melanoma Res** 2005; 15:169-77.

[NCI] National Center Institute. **General information about melanoma**. Available from: <URL:<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma/Patients/page1>> [2011 jan 11].

Ogino S, Shima K, Baba Y, et al. Colorectal cancer expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG, PPARgamma) is associated with good prognosis. **Gastroenterology** 2009; 136:1242-50.

Oliveira Filho RS, Jorge MC, Oliveira DA, Oliveira RL, Queiroz MCA, Nahas FX. Mitose como fator prognostico para biopsia de linfonodo sentinela em melanoma fino. **An Bras Dermatol** 2011; 86:107-9.

Owen SA, Sanders LL, Edwards LJ, Seigler HF, Tyler DS, Grichnik JM. Identification of higher risk thin melanomas should be based on Breslow depth not Clark level IV. **Cancer** 2001; 91:983-91.

Ozdemir NO, Türk NS, Düzcan E. IMP3 expression in urothelial carcinomas of the urinary bladder. **Türk Patoloji Derg** 2011; 27:31-7.

Panigrahy D, Huang S, Kieran MW, Kaipainen A. PPARgamma as a therapeutic target for tumor angiogenesis and metastasis. **Cancer Biol Ther** 2005; 4:687-93.

Phan A, Touzet S, Dalle S, Ronger-Savlé S, Balme B, Thomas L. Acral lentiginous melanoma: histopathological prognostic features of 121 cases. **Br J Dermatol** 2007; 157:311-8.

Pectasides D, Dafni U, Bafaloukos B, et al. Randomized phase III study of 1 month versus 1 year of adjuvant high-dose interferon alfa 2-b in patients with resected high-risk melanoma. **J Clin Oncol** 2009; 27:939-44.

Peters JM, Shah YM, Gonzalez FJ. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. **Nat Rev Cancer** 2012; 12:181-95.

Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA, Xu H. IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. **Mod Pathol** 2008; 21:431-7.

Rezze GG. **Análise de aspectos moleculares no modelo de progressão do melanoma cutâneo por meio do estudo imunoistoquímico (tissue Microarray-TMA)**. São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

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

Roda JM, Sumner LA, Evans R, Phillips GS, Marsh CB, Eubank TD. Hypoxia-inducible factor-2 α regulates GM-CSF-derived soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 production from macrophages and inhibits tumor growth and angiogenesis. **J Immunol** 2011; 187:1970-6.

Rubin MA. Use of laser capture microdissection, cDNA microarrays, and tissue microarrays in advancing our understanding of prostate cancer. **J Pathol** 2001; 195:80-6.

Ruffini F, Failla CM, Orecchia A, et al. Expression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in cutaneous melanoma: role in tumour progression. **Br J Dermatol** 2011; 164:1061-70.

Quéreux G, Moyse D, Lequeux Y, et al. Development of an individual score for melanoma risk. **Eur J Cancer Prev** 2011; 20:217-24.

Sá BCS. **Criação de Tissue arrays de melanomas cutâneos extensivos superficiais para estudo imunoistoquímico de fatores ligados à proliferação e apoptose celular**. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Salvio AG, Marques MEA. Imuno-histoquímica para identificação de células neoplásicas no infiltrado ativo de melanomas fino. **J Bras Patol Med Lab** 2006; 42:143-148.

Schepsky A, Bruser K, Gunnarsson GJ, et al. The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with beta-catenin to determine target gene expression. **Mol Cell Biol** 2006; 26:8914-27.

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

Singh N, Jani PD, Suthar T, Amin S, Ambati BK. Flt-1 intrareceptor induces the unfolded protein response, apoptotic factors, and regression of murine injury-induced corneal neovascularization. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2006; 47:4787-93.

Sitnikova L, Mendese G, Liu Q, et al. IMP3 predicts aggressive superficial urothelial carcinoma of the bladder. **Clin Cancer Res** 2008; 14:1701-6.

Smyth TD, Chen H, Park J, Presta LG, Ferrara N. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Fit-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. **EMBO J** 1996; 15:4919-27.

Soengas MS, Lowe SW: Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene** 2003; 22: 3138-51.

Stalkup JR, Orengo IF, Katta R. Controversies in acral lentiginous melanoma. **Dermatol Surg** 2002; 28:1051-9.

Steingrimsson E, Tessarollo L, Pathak B, et al. Mitf and Tfe3, two members of the Mitf-Tfe family of bHLH-Zip transcription factors, have important but functionally redundant roles in osteoclast development. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:4477-82.

Straume O, Akslen LA. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors (FLT-1, KDAR) and TSP-1 related to microvessel density and patient outcome in vertical growth phase melanomas. **Am J Pathol** 2001; 159:223-35.

Strub T., Giuliano S., Ye T, et al. Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. **Oncogene** 2011; 30:2319-32.

[SEER] Surveillance Epidemiology and end Results. **SEER cancer statistics review 1975-2000**. Available from: <URL:http://seer.cancer.gov/csr/1795_2007/results_merged/topic_topfifteen.pdf> [2011 ago 10].

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

Truong LD, Shen SS. Immunohistochemical diagnosis of renal neoplasms. **Arch Pathol Lab Med** 2011; 135:92-109.

Vartanian A, Stepanova E, Grigorieva I, Solomko E, Baryshnikov A, Lichinitser M. VEGFR1 and PKC α signaling control melanoma vasculogenic mimicry in a EGFR2 kinase-independent manner. **Melanoma Res** 2011; 21:91-8.

Veeranki S, Duan X, Panchanathan R, Liu H, Choubey D. IFI16 protein mediates the anti-inflammatory actions of the type-I interferons through suppression of activation of caspase-1 by inflammasomes. **PLoS ONE** 2011; 1-10.

Vural B, Atalar F, Ciftci C, et al. Presence of fatty-acid-binding protein 4 expression in human epicardial adipose tissue in metabolic syndrome. **Cardiovasc Pathol** 2008; 17:392-8.

Wang YX. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. **Cell Res** 2010; 20:124-37.

Warycha MA, Christos PJ, Mazumdar M, et al. Changes in the presentation of nodular and superficial spreading melanomas over 35 years. **Cancer** 2008; 113:3341-8.

Weber AL, Nunes DH, Souza Filho JJ, Pinto CJC. Avaliação de 496 laudos anatomopatológicos de melanoma diagnosticados no município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **An Bras Dermatol** 2007; 82:227-32.

Weber J. Overcoming immunologic tolerance to melanoma: targeting CTLA-4 with ipilimumab (MDX-010). **Oncologist** 2008; 13:16-25.

Widlund HR., Horstmann MA., Price ER, et al. Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. **J Cell Biol** 2002; 158:1079-87.

Xin H, D'Souza S, Jørgensen TN, et al. Increased expression of ifi202, an ifn-activatable gene, in B6.Nba2 lupus susceptible mice inhibits p53-mediated apoptosis. **J Immunol** 2006; 176:5863-70.

Yates F. Contingency table involving small numbers and the χ^2 test". **J Royal Statist Soc** 1934; 1(Suppl):217-35.

Yuan RH, Wang CC, Chou CC, Chang KJ, Lee PH, Jeng YM. Diffuse expression of rna-binding protein IMP3 predicts high-stage lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal adenocarcinoma. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:1711-9.

Zheng W, Yi X, Fadare O, et al. The oncofetal protein IMP3: a novel biomarker for endometrial serous carcinoma. **AmJ Surg Pathol** 2008; 32:304-15.

Zimmerman M, Yang D, Hu X, et al. IFN- γ upregulates survivin and Ifi202 expression to induce survival and proliferation of tumor-specific T cells. **PLoS One** 2010; 5:e14076.

Zhang Y, Howell RD, Alfonso DT, et al. IFI16 inhibits tumorigenicity and cell proliferation of bone and cartilage tumor cells. **Front Biosci** 2007; 12:4855-63.

Anexo 1 - Ficha de Coleta de Dados Melanoma Superficial

Nome: _____ RGH: _____ Data de Preenchimento: ____/____/____
Idade ao Diagnóstico: ____/____/____ Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: F (1) M (2)
Raça: Branca (1) Amarela (2) Parda (3) Negra (4)
Nacionalidade: (1) Brasileiro (2) Outras Naturalidade: _____

História Familiar

Fototipo	}	(1) Sim
Nevo Atípico		
Nevo Congênito		
Nevos Múltiplos		
História Queimadura		
Melanoma na Gravidez		
Tumor Metacrônico		
Nevo Pré-Existente		
Ulceração		
Regressão		
LNS		
Presença Metastática		
Meta em Pele		
Meta Linfonodal		
Meta Visceral		
Primeira Alteração Estadio		
Segunda Alteração Estadio		

<u>Clark</u>	(1)	I	<u>Local</u>	(1)	Cabeça e Pescoço
	(2)	II		(2)	Tronco
	(3)	III		(3)	MMSS
	(4)	IV		(4)	MMII
	(5)	V		(5)	Mãos ou Pés

Tipo Histológico (1) Extensivo Superficial
(2) "In Situ"

Fase de Crescimento (1) Vertical
(2) Radial

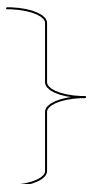
<u>Breslow</u>	(0)	< 1,0 mm	<u>Tamanho Nevo</u>	(1)	Gigante
	(1)	1,01-2,0 mm		(2)	Médio
	(2)	2,01-4,0 mm		(3)	Pequeno
	(3)	> 4,0mm			
	(4)	mis			

<u>Quantidade Nevos</u>	(1) < 50 (2) ≥ 50	<u>Tamanho Meta</u>	(1) Micro (2) Macro
<u>Base</u>	(1) Axilar (2) Inguinal (3) Cervical (4) Poplítea (5) LNS Não Encontrado (6) Axilar e Inguinal (7) Axilar e Outra (8) Inguinal e Outra	<u>Tratamento Adjuvante</u>	(1) IFN (2) IL2 (3) Vacina Autóloga (4) Vacina Peptídeo (5) Nenhum (6) Radioterapia (7) Crioterapia (8) IFN, IL2 e Vacina Autóloga
<u>Tipo Meta em Pele</u>	(1) Satelitose ou Transito (2) Subcutâneo		
<u>Cadeias Acometidas</u>	(1) Axilar (2) Inguinal (3) Cervical (4) Poplítea (5) Outras	<u>Víscera de Metástase</u>	(1) Pulmão (2) Cérebro (3) Fígado (4) Ossos (5) Outros
<u>Quimioterapia</u>	(1) monoQT (2) poliQT (3) bioQT (4) Perfusão extremidades (5) Outras (6) Nenhum		
<u>Estadimanto</u>	T N M	} os 3 se iniciam no “1”	
Estadiamento final se inicia no “0”			
<u>Estado do Paciente</u>	(1) Vivo com Doença (2) Vivo sem Doença (3) Morte por Câncer (4) Morte por Outras Causas (5) Perdeu Seguimento		

Anexo 2 - Ficha de Coleta de Dados Melanoma Acral

Número do AP: _____ RGH: _____ Data de Nascimento: __/__/__
Idade ao Diagnóstico: __/__/__ Data do Diagnóstico: __/__/__
Sexo: M (1) F (2) Naturalidade: _____
Raça: Branca (1) Amarela (2) Parda (3) Negra (4) Outra (5) Sem Informação (9999)
Nacionalidade: (1) Brasileiro (2) Outras. Qual? _____
Material: (1) Pele (2) Outros Diagnóstico: (1) Melanoma Maligno (2) Outros
Local da Lesão: _____

História Familiar de Melanoma Maligno		(1) Sim (2) Não (9999) Sem Informação
Fototipo de Pele		
Nevo Melanocítico Atípico		
Nevo Congênito		
Nevo Melanocítico Múltiplo		
História de Queimadura Solar		
Melanoma Relacionado à Gravidez		
Tumor Metacrônico		
Nevo Pré-Existente		
Ulceração		
Regressão		
Pesquisa de LNS		
Presença de Metástase		
Metástase em Pele		
Metástase Linfonodal		
Metástase Visceral		
Primeira Alteração de Estadio		
Segunda Alteração de Estadio		
Sateliiose ou em Trânsito		
Subcutâneo		
Linfonodal		
Víscera		

Infiltrado Inflamatório Peritumoral		(1) Presente (2) Ausente (9999) Sem Informação
Infiltrado Inflamatório Intra-Tumoral		
Invasão Vasc. Linfática		
Invasão Vasc. Sangüínea		
Invasão Peri-Neural		
Nódulos Satélites		
Presença de Recidiva Local		

Data de Recidiva Local: __/__/__ Data da Metástase: __/__/__
Data da Cirurgia: __/__/__

Tamanho do Tumor da Lesão Primária (cm): _____

Local Lesão Primária: (1) Cabeça e Pescoço (2) Tronco (3) MMSS (4) MMII (5) Mãos (6) Pés (9999) Sem Informação

Clark: (1) I (2) II (3) III (4) IV (5) V

Base Pesquisada: (1) Axilar D (2) Axilar E (3) Inguinal D (4) Inguinal E (5) Cervical D (6) Cervical E (7) Poplítea D (8) Poplítea E (9) Outras (9999) Sem Informação

Tratamento Adjuvante (1) IFN (2) IL2 (3) Vacina Autóloga (4) Vacina Peptídeo (5) Outros (6) Nenhum (9999) Sem Informação

Quimioterapia: (1) monoQT (2) poliQT (3) bioQT (4) Perfusão Extremidade (5) Outras (6) Nenhum (9999) Sem Informação

Estádio: (1) 0 (2) IA (3) IB (4) IIA (5) IIB (6) IIC (7) IIIA (8) IIIB (9) IIIC (10) IV (9999) Sem Informação

<u>T</u>	(1) T0	<u>N</u>	(1) N0	<u>M</u>	(1) M0
	(2) Tx		(2) Nx		(2) Mx
	(3) Tis		(3) N1a		(3) M1a
	(4) T1a		(4) N1b		(4) M1b
	(5) T1b		(5) N2a		(5) M1c
	(6) T2a		(6) N2b		(9999) Sem Informação
	(7) T2b		(7) N2c		
	(8) T3a		(8) N3		
	(9) T3b		(9999) Sem Informação		
	(10) T4a				
	(11) T4b				

(9999) Sem
Informação

Data da Última Notícia: __/__/__

Status: (1) Vivo com Doença
(2) Vivo sem Doença
(3) Morte por Câncer
(4) Morte por Outras Causas
(9999) Sem Informação

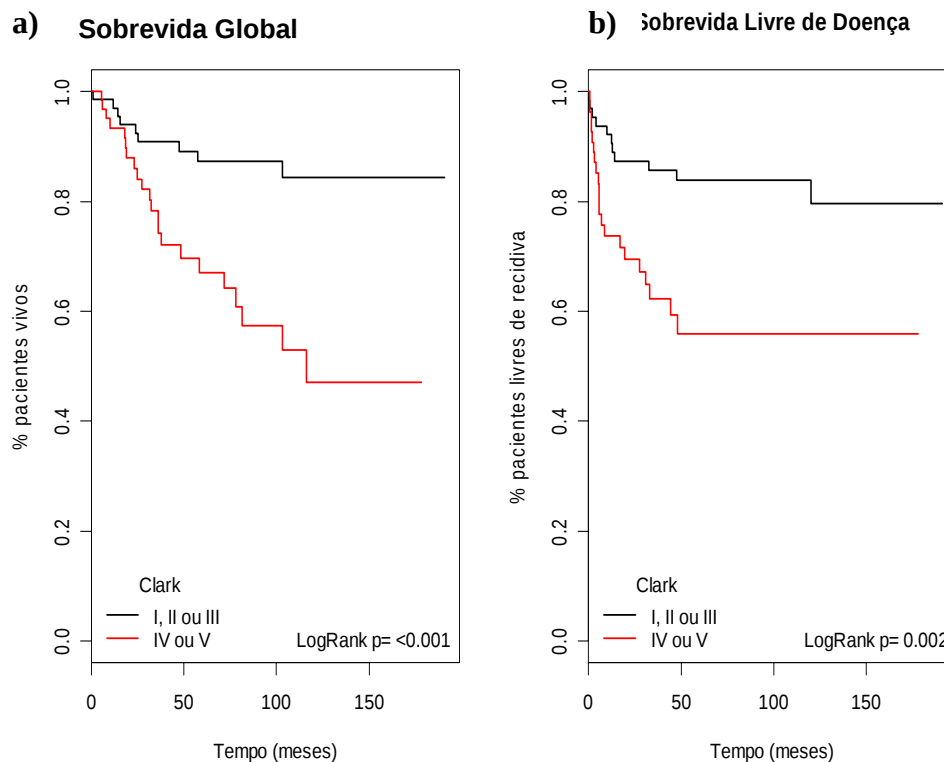
Breslow: _____
Índice mitótico (mm): _____

Tipo Histológico: (1) Invasivo
(2) "in situ"
(9999) Não Avaliável

Fase de Crescimento: (1) Vertical
(2) Radial

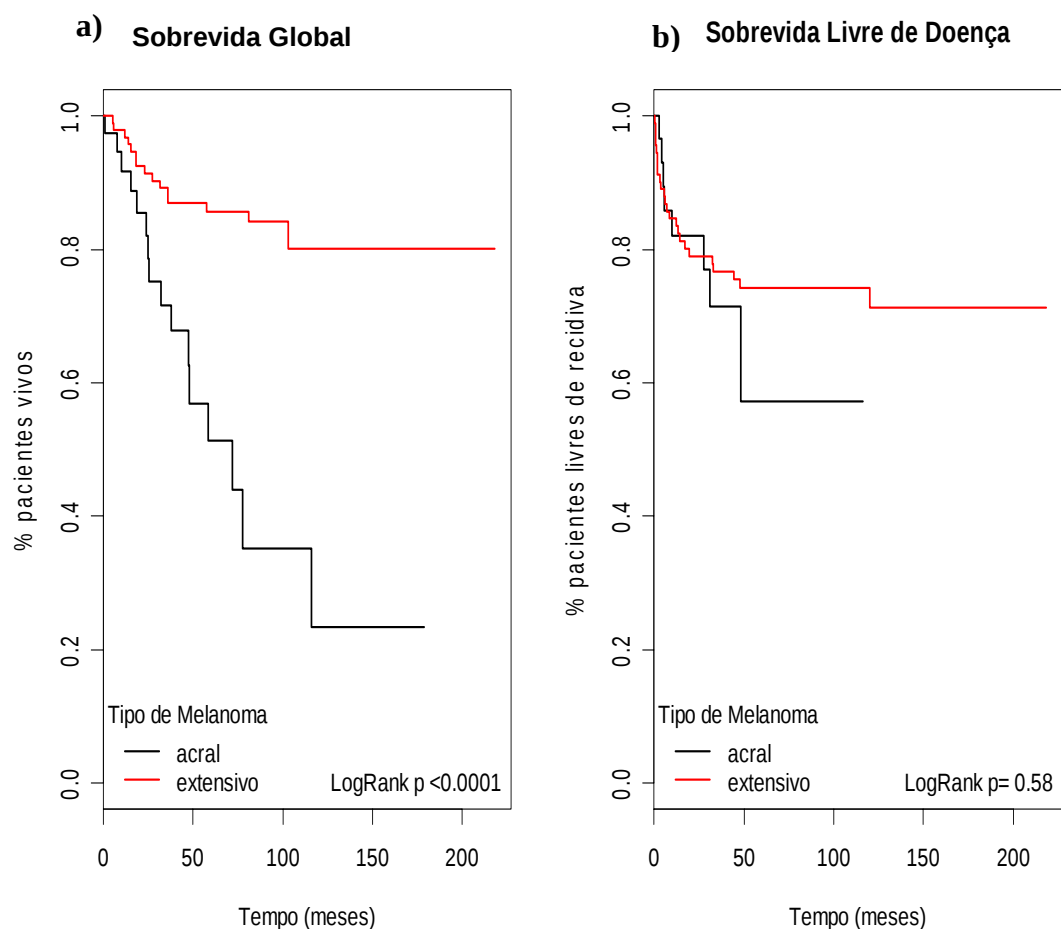
Anexo 3 – Análise dos dados do estudo, excluindo-se os melanomas *in situ*

A análise dos resultados das características clínico-patológicas do tumor em relação à sobrevida global e a sobrevida livre de doença dos pacientes, excluindo-se os casos de melanomas *in situ*, demonstraram sobrevida pior para os casos com nível de Clark IV e V (Figura 1), de melanoma do tipo acral lentiginoso (Figura 2), com índice mitótico >10mitoses/campo (Figura 3) e com acometimento linfonodal (Figura 4).



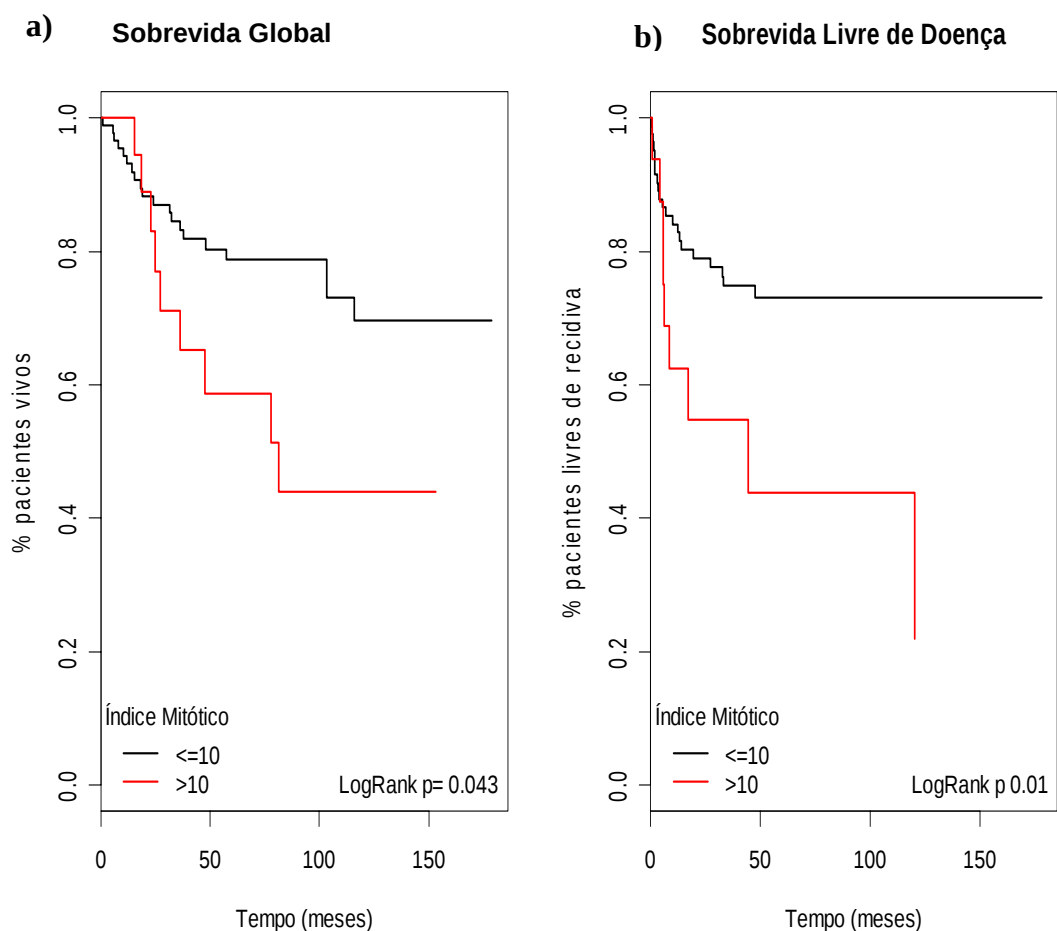
Legenda: **a)** Sobrevida Global com a porcentagem de pacientes vivos em função do tempo em meses de acordo com o nível de Clark, excluindo os melanomas *in situ*. **b)** Sobrevida Livre de Doença com a porcentagem de pacientes livres de recidiva em função do tempo em meses de acordo com o nível de Clark, excluindo os melanomas *in situ*. O gráfico demonstrou sobrevida inferior para tumores nos níveis IV ou V.

Figura 1– Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com Nível de Clark. As curvas foram calculadas empregando-se o método de Kaplan-Meier e as comparações foram realizadas com o teste do log-rank considerando-se $p < 0,05$.



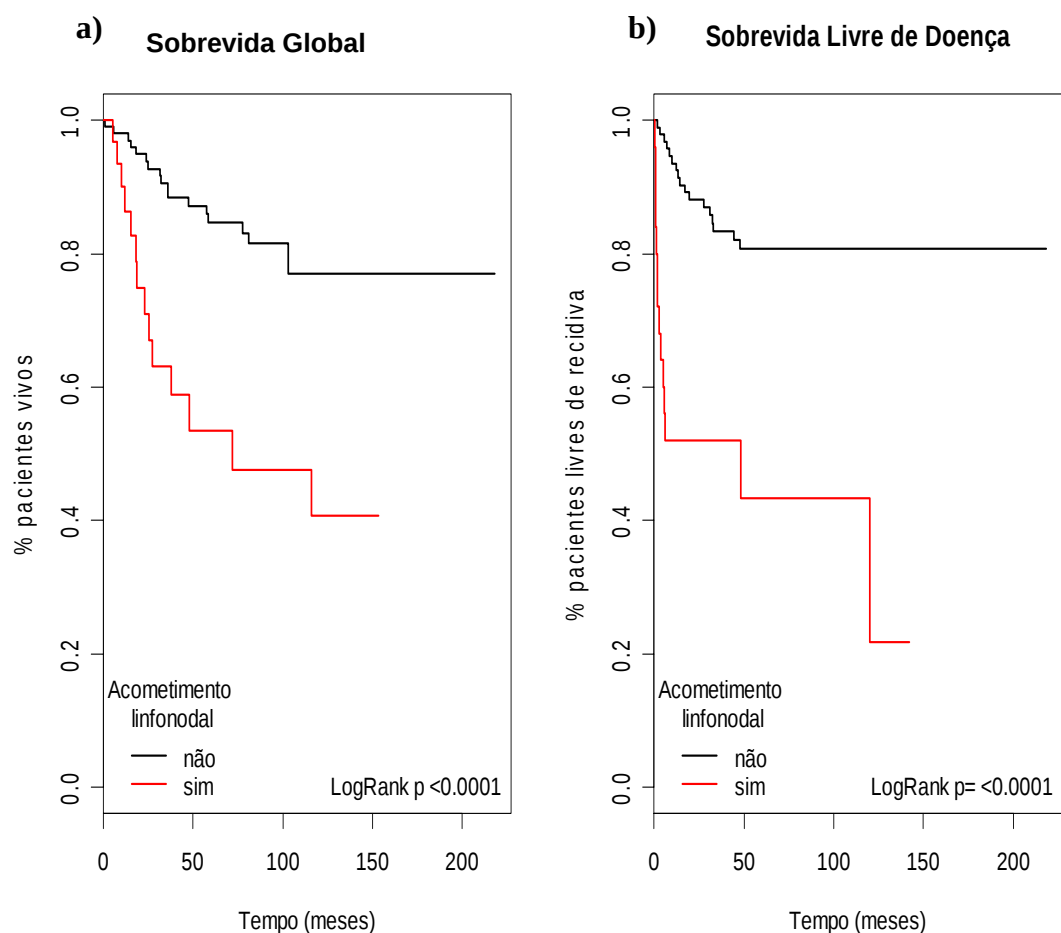
Legenda: **a)** Sobrevida Global com a porcentagem de pacientes vivos em função do tempo em meses de acordo com o tipo de melanoma acral ou extensivo, excluindo os melanomas *in situ*. **b)** Sobrevida Livre de Doença com a porcentagem de pacientes livres de recidiva em função do tempo em meses de acordo com o tipo de melanoma acral ou extensivo, excluindo os melanomas *in situ*. O gráfico demonstrou resultado pior para melanoma do tipo acral.

Figura 2 – Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com tipo de melanoma (acral x extensivo superficial).



Legenda: **a)** Sobrevida Global com a porcentagem de pacientes vivos em função do tempo em meses de acordo com o índice mitótico, excluindo os melanomas *in situ*. **b)** Sobrevida Livre de Doença com a porcentagem de pacientes livres de recidiva em função do tempo em meses de acordo com o índice mitótico, excluindo os melanomas *in situ*. O gráfico demonstrou resultado pior para melanoma do tipo acral.

Figura 3 – Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com índice mitótico.



Legenda: **a)** Sobrevida Global com a porcentagem de pacientes vivos em função do tempo em meses de acordo com o acometimento linfonodal, excluindo os melanomas *in situ*. **b)** Sobrevida Livre de Doença com a porcentagem de pacientes livres de recidiva em função do tempo em meses de acordo com o acometimento linfonodal, excluindo os melanomas *in situ*. O gráfico demonstra resultado pior para presença de acometimento linfonodal.

Figura 4 – Análise sobrevida global e livre de doença de acordo com o acometimento linfonodal.

Tabela 1- Análise multivariada das variáveis clínico-patológicas sobre a sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) excluindo os melanomas *in situ*.

SCE (n=54)					
Variável	categoria	RR	IC (95%)		p
Breslow					
	<=2	1	-	-	
	>2	5,53	0,74	41,36	0,096
PPARG					
	positivo	1	-	-	
	negativo	2,34	0,18	1,04	0,060

SLD (n=60)					
Variável	categoria	RR	IC (95%)		p
Breslow					
	<=2	1	-	-	
	>2	4,14	0,94	18,19	0,060
VEGFR1					
	negativo	1	-	-	
	positivo	2,44	0,97	6,12	0,058

Na análise multivariada, após a retirada dos casos de melanoma *in situ*, o Breslow e a expressão de PPARG se mantiveram como variáveis independentemente associadas com sobrevida global.

Em relação a sobrevida livre de doença, PPARG saiu do modelo de regressão, após a exclusão dos casos de melanoma *in situ*, e a expressão de VEGFR1 entrou no modelo, em substituição. Da mesma forma, o estágio perdeu a significância, e o Breslow mostrou-se estatisticamente associado, de maneira independente, com a sobrevida livre de doença.

Foram incluídos no modelo de análise multivariada a expressão de todos os marcadores, o estadiamento, o índice de Breslow e o acometimento linfonodal (Tabela 19).