

**ANÁLISE DE ASPECTOS MOLECULARES NO
MODELO DE PROGRESSÃO DO MELANOMA
CUTÂNEO POR MEIO DO ESTUDO
IMUNOISTOQUÍMICO (*TISSUE MICROARRAY-TMA*)**

GISELE GARGANTINI REZZE

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do Título de
Doutorado em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Gilles Landman

Co-Orientador: Dr. João Pedreira Duprat Neto

São Paulo

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Rezze, GG

Análise de aspectos moleculares no modelo de progressão do melanoma cutâneo por meio do estudo imunoistiquímico (*tissue microarray-TMA*) / Gisele Gargantini Rezze – São Paulo, 2008.

116p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Gilles Landman

Descritores: 1. IMUNOHISTOQUIMICA. 2. MELANOMA. 3. CONEXINA
43 4. MOLÉCULAS DE ADESÃO INTERCELULAR 5. CITOCERATINAS. 6.
CALICREINA. 7. TISSUE ARRAY ANALYSIS.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

A minha filha Nicole e sobrinha Yasmin

A minha irmã e às geminhas Clara e Sofia

A minha querida avó Yolanda

Ao meu tio Júnior (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Esta tese foi fruto de muito esforço e colaboração. Se não houvesse boa vontade e competência de todas as pessoas envolvidas eu não realizaria este trabalho. Agradeço pela amizade e sentimentos positivos de todos aqueles que me ajudaram.

Agradeço a Deus por me dar sabedoria e capacidade para o trabalho.

Agradeço minha mãe, Sônia, por ser a pessoa que sempre cuidou de todos nós e com quem posso contar incondicionalmente.

Agradeço meu pai, Cecil, pelos conselhos sábios na hora certa. Obrigada por ter nos acolhido!

Agradeço a toda minha família pela torcida e carinho sempre.

Agradeço a Maria José por toda a sua ajuda, principalmente espiritual. Obrigada por sua amizade e por tomar conta de mim como uma segunda mãe.

Agradeço ao meu orientador Dr. Gilles Landman por ter me dado esta oportunidade e por ter confiança na minha capacidade profissional, principalmente nos momentos mais difíceis (que não foram poucos!). “Gilles, meu maior agradecimento está dentro do meu coração.”

Agradeço ao diretor da pós-graduação Prof. Doutor Fernando Augusto Soares por toda a sua compreensão e apoio sempre! Em todos os momentos de insegurança a sua atitude firme me dava ânimo para continuar.

Agradeço ao Dr. João Duprat, meu chefe, por sempre me valorizar profissionalmente e também acreditar na viabilidade deste trabalho. João a sua ajuda é sempre tão calma e tão importante nas horas em que pareço um furacão!

Agradeço ao Dr. Rogério Izar Neves por ter me incentivado na vida acadêmica e profissional.

Agradeço a Fernanda, assistente de pesquisa do departamento de oncologia cutânea, pela paciência de levantar e digitar meus dados e por ter me ajudado a terminar as benditas tabelas!

Agradeço ao Ivan por ter realizado todas as reações imunoistoquímicas. Eu não sabia que você era um verdadeiro artista!

Agradeço ao Seven pela amizade e boa vontade. Você sempre encontrou tempo para me ajudar!

Agradeço ao Carlinhos pela confecção dos TMAs de nevos e melanomas finos. Que bom que conseguimos afiar o punch com uma lixa de unha!

Agradeço a Dirlei e ao Hugo, meus fiéis escudeiros, pela amizade, compreensão e força!

Agradeço ao José Humberto pela estatística fantástica! Foi muito bom receber os resultados finais!

Agradeço ao meu amigo Ernesto que me salvou no meio de tantas tabelas!

Agradeço a minha amiga Roberta por ser sempre o meu porto seguro!

Agradeço a Clara por ter me ajudado a realizar uma parte muito chata do levantamento de dados e sempre com um sorriso no rosto.

Agradeço a Ana Kuninari, coordenadora da pós-graduação da FAP, pela amizade e carinho. Eu também confio em Deus.

Agradeço a querida Suely por todo o trabalho com a formatação, bibliografia e muitas outras coisas! Su, você é 10!

Agradeço ao Moris por compartilhar comigo o sofrimento de utilizar o ACIS. Obrigada por me ensinar tanto!

Agradeço a Gilmara por fazer o possível e o impossível para agendar um horário com seu chefe!

Agradeço a Dra. Bianca por ter realizado o TMA de melanoma invasivo e agradeço ao Dr. Christiano pelo TMA de melanoma com LNS positivo.

Agradeço ao Dr. Luiz Fernando Lima Reis pela idéia da realização deste trabalho.

Agradeço a Nair e Waleska por realizarem um trabalho tão valioso e que deu origem a minha tese.

Agradeço ao Dr. Alexandre por me ouvir, você sempre foi um bom amigo!

Agradeço às pós-docs Claudia e Marcilei por toda ajuda com o ACIS.

Agradeço a boa vontade de todos os alunos da pós do departamento de anatomia patológica.

Agradeço ao meu amigo Otávio pelo incentivo. Eu sinto a sua falta no dia-a-dia do hospital.

Agradeço a Dete por ter paciência com meus papéis espalhados na sala do computador.

Agradeço a Rosanira pelas orações e pelas risadas.

Agradeço às amigas Camila, Fafá, Pires e Bia pelos encontros divertidos que me faziam esquecer o tanto que eu ainda tinha que realizar!

Agradeço à auxiliar Gláucia e à enfermeira Leila pelos momentos de descontração durante o atendimento no hospital.

Agradeço toda equipe da biblioteca pela qualidade e rapidez no atendimento.

Agradeço a Rosi por me salvar em horas cruciais!

Agradeço a Simone e Fátima por estarem sempre bem humoradas e interessadas no andamento do meu trabalho.

Agradeço a todos os técnicos do departamento de anatomia patológica que direta ou indiretamente me ajudaram.

Agradeço aos médicos do departamento de anatomia patológica por sempre me tratarem com gentileza e muita consideração.

Agradeço a todos do meu departamento, oncologia cutânea, pelo trabalho de excelência que realizamos no dia-a-dia.

Agradeço aos pacientes que são os nossos maiores parceiros!

RESUMO

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

Introdução: O melanoma cutâneo é uma neoplasia de comportamento biológico muito agressivo e se origina dos melanócitos localizados na camada basal da epiderme. A sua incidência vem aumentando mundialmente na população branca. Elder e colaboradores propuseram um modelo de desenvolvimento e progressão dos melanomas baseado em modelos experimentais, observações clínicas e histopatológicas. Este modelo é composto por seis etapas: melanócito precursor, nevos comuns, com presença de melanócitos normais, nevos displásicos, com presença de atipia estrutural e arquitetural dos melanócitos, melanoma de crescimento radial (intraepidérmico), melanoma de crescimento vertical (invasão da derme) e melanoma metastático. Novas tecnologias, como o TMA estão sendo utilizadas para o estudo de proteínas no modelo de progressão tumoral utilizando-se de nevos comuns, nevos atípicos, melanomas primários e metastáticos. Estes estudos permitem avaliar o comportamento de marcadores envolvidos no desenvolvimento e progressão do melanoma na tentativa de caracterizar os eventos moleculares e celulares e auxiliar no entendimento da transformação de um nevo em melanoma. Objetivos: Estudar as proteínas conexina 43, desmocolina 3, citoceratina 5, calicreina 6 e calicreinas 7, que estão envolvidas em adesão e comunicação celular no modelo de progressão do melanoma cutâneo. Material e métodos: Por meio da técnica de TMA foram analisados 59 amostras de nevos comuns, 29 de nevos atípicos 133 melanomas invasivos e 29 metástases. Foi realizada imunohistoquímica com utilização do *permanent red* para as proteínas conexina 43, desmocolina 3 e citoceratina 5. Para as reações de calicreina 6

e 7, foi realizada a revelação com diaminobenzidina (DAB). A leitura das lâminas foi realizada utilizando-se a microscopia digital (ACIS III). Para a avaliação da expressão de cada anticorpo foi utilizado o escore combinado (EC) devido a utilização de parâmetros de intensidade e quantidade da área marcada. Para a análise estatística empregou-se o teste de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis na comparação de valores medianos de expressão dos marcadores biomoleculares. O teste de Tukey foi utilizado para avaliar a correlação entre os marcadores dois a dois. A correlação entre os marcadores biomoleculares foi realizada por meio do coeficiente de Spearman. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%.

Resultados: A expressão de conexina 43 foi maior em melanoma em relação aos nevos atípicos e comuns. A comparação da expressão de conexina 43 entre nevos comuns e atípicos não se mostrou estatisticamente significativa. Na avaliação entre a expressão de conexina 43 e a espessura do tumor (índice de Breslow) e expressão de conexina 43 e estadiamento do tumor, não houve resultado estatisticamente significativo. Na avaliação da expressão de conexina 43 e o status linfonodal, a maior expressão foi nos pacientes que apresentavam metástase. A expressão de desmocolina 3 foi maior nos melanomas em relação aos nevos comuns e atípicos. A comparação da expressão de desmocolina 3 entre nevos comuns e atípicos não se mostrou estatisticamente significativa. Na avaliação entre a expressão de desmocolina 3 e a espessura do tumor (índice de Breslow) e expressão de desmocolina 3 e estadiamento do tumor, não houve resultado estatisticamente significativo. Na avaliação da expressão de desmocolina 3 e o status linfonodal, a maior expressão foi nos pacientes que apresentavam metástase. A expressão de citoceratina 5 foi maior nos nevos atípicos em relação aos melanomas e nevos comuns. A expressão de citoceratina 5 foi maior nos melanomas em relação aos nevos comuns. Na comparação entre a expressão de citoceratina 5 e a espessura de Breslow, os melanomas finos apresentaram maior expressão em relação aos melanomas acima de 1mm. Na comparação entre a expressão de citoceratina 5 e o estágio do melanoma, o estágio I apresentou maior expressão em relação ao estágio II

e III e IV. Na avaliação da expressão de CK5 e o status linfonodal, a maior expressão foi nos pacientes que apresentavam metástase. A KLK6 apresentou expressão aumentada nos melanomas em relação aos nevos. Na comparação entre a expressão de KLK6 e a espessura do tumor e entre a expressão de KLK6 e o estágio do melanoma, não houve resultado estatisticamente significativo. A expressão de KLK7 foi maior nos nevos atípicos em comparação com os nevos comuns e o melanoma. A expressão de KLK7 foi maior nos melanomas em comparação com os nevos comuns. Na avaliação da expressão de KLK7 e a espessura do tumor, os melanomas com espessura maior que 4mm apresentaram maior expressão em comparação aos melanomas finos (<1mm) e intermediários (1,01-4,00mm). Na avaliação da expressão de KLK7 com o estadiamento do melanoma, o estágio I apresentou maior expressão em relação ao estágio II. Na avaliação da expressão de KLK7 e o status linfonodal, a maior expressão foi nos pacientes que não apresentavam metástase. Na correlação entre a expressão dos marcadores houve correlação positiva e moderada entre Cx43 e DSC3 e entre KLK6 e KLK7. Conclusão: A microscopia digital permitiu a realização da comparação da expressão imunoistoquímica dos marcadores com o modelo de progressão do melanoma. A expressão de desmocolina 3 e conexina 43 foi maior em melanomas comparado aos nevos comuns e atípicos. A expressão de citoceratina 5 e caliceína 7 foi maior em nevos atípicos em relação aos melanomas e nevos comuns e maior nos melanoma em relação aos nevos comuns. A expressão de caliceína 6 foi maior em melanomas em relação aos nevos comuns. Houve uma correlação positiva e moderada entre a expressão de conexina 43 e desmocolina 3 e entre caliceína 6 e caliceína 7. Conclusão final: as proteínas de adesão e comunicação celular poderiam contribuir no desenvolvimento tumoral descrito no modelo de progressão do melanoma.

SUMMARY

Rezze GG. **[Analysis of the molecular aspects on the progress melanoma model using the immunohistochemical study (*tissue microarray-TMA*)** São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente]

Cutaneous melanoma is an aggressive cancer, derived from the epidermal basal layer melanocytes. The incidence is growing around the world in caucasians. Based on experimental, clinical and histopathological observations Elder et al., proposed a development and progression melanoma model. New high throughput methods such as tissue microarray (TMA) are being used to evaluate the role of numerous proteins on the melanoma progression model using common nevus, atypical nevus, primary melanomas and metastatic melanomas. These studies allow to establish their participation in the melanoma model and to characterize the molecular and cellular events and help to better understand the pathways involved in melanoma pathogenesis. Adhesion molecules and related proteins have been reported to have a role in this pathway. The purpose of this study was to evaluate the immunohistochemical participation of connexin 43 (Cx43), desmocollin 3 (DSC3), citokeratin 5 (CK5), kalikrein 6 (KLK6) and kalikrein 7 (KLK7), cellular adhesion and communication proteins, in the progression melanoma model. We analyzed 59 samples of common nevus, 29 atypical nevus, 133 invasive and 29 metastatic melanomas by TMA. The immunostaining was evaluated with digital microscopy (ACIS III). Connexin 43 and DSC3 expression was higher in melanoma compared to atypical and common nevi ($p < 0,001$). CK5 expression was higher in atypical nevus than in melanomas and common nevus ($p < 0,001$). The CK5 expression on melanomas had higher expression than common nevus ($p < 0,001$). Thin melanomas had higher CK5 expression than the intermediate and thick melanomas ($>1\text{mm}$) ($P < 0,001$). Stage I had higher CK5 expression than

stage II and III/IV ($p=0,006$ and $p=0,004$). CK5 expression was also higher in patients with lymph node metastasis ($p<0,001$). Higher KLK6 expression was found in melanomas compared to common nevus ($p<0,001$). A higher KLK7 expression was found in atypical nevus compared to common nevus and melanoma ($p<0,001$). Its expression was higher in melanomas than the common nevus ($p<0,001$). Higher KLK7 expression was found in thick melanomas ($>4\text{mm}$) compared to thin ($<1\text{mm}$) ($p=0,014$). Stage I melanomas had higher KLK7 expression in relation to the stage II melanomas ($p=0,045$). A higher expression was found in patients with no metastatic lymph node ($p=0,005$). The correlation was positive between Cx43 and DSC3 and between KLK6 and KLK7. The digital microscopy allowed us to study the expression of the biomarkers in melanoma. The expression of DSC3 and Cx43 were higher in melanomas than common and atypical nevus. The expression of CK5 and KLK7 were higher on atypical nevus than common nevus and melanomas and higher on the melanomas than the common nevus. The KLK6 expression was higher on melanomas than the common nevus. There was a positive and moderate correlation between Cx43 and DCS3 and KLK6 and KLK7. In the final conclusion: the cellular adhesion and communication proteins may contribute to melanoma pathogenesis in the context of the melanoma progression model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo de progressão tumoral em melanomas.....	19
Figura 2	Modelo de descamação da epiderme.....	29
Figura 3	A confecção do TMA.....	45
Figura 4	Esquema da marcação em cruz (utilizando-se a circunferência em cruz de 40X) utilizada para cada amostra do TMA.....	50
Figura 5	Exemplo de menor expressão na membrana celular (imunistoquímica de Cx43 em células do melanoma cutâneo, Microfotografia 400X).....	51
Figura 6	Exemplo de maior expressão na membrana celular (imunistoquímica de Cx43 em células do melanoma cutâneo, Microfotografia 400X).....	51
Figura 7	Microfotografia (400X): Expressão imunistoquímica de DSC3 em células névicas.....	82
Figura 8	Microfotografia (400X): Expressão imunistoquímica de DSC3 em células do melanoma.....	82
Figura 9	Microfotografia (400X): Expressão imunistoquímica de Cx43 em células do melanoma.....	86
Figura 10	Microfotografia (400X): Expressão imunistoquímica de Cx43 em células névicas.....	86

Figura 11	Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de CK5 em células de nevo comum.....	91
Figura 12	Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de CK5 em células atípicas do nevo atípico.....	91
Figura 13	Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de CK5 em células do melanoma cutâneo.....	92
Figura 14	A estrutura do desmossomo e sua correlação com CK5.....	93
Figura 15	Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de KLK6 em células névicas.....	96
Figura 16	Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de KLK6 em células de melanoma.....	96
Figura 17	Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de KLK7 em células névicas.....	97
Figura 18	Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de KLK7 em células atípicas do nevo atípico.....	97
Figura 19	Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de KLK7 em células do melanoma.....	98
Figura 20	Modelo de progressão tumoral em melanomas e a expressão das proteínas estudadas.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição da frequência e porcentagem dos tipos de lesão em relação ao total de lesões estudadas.....	55
Tabela 2	Descrição da média e mediana da idade ao diagnóstico, índice de Breslow, índice mitótico, número de linfonodos sentinelas positivos e número de linfonodos sentinelas encontrados para os casos de melanoma cutâneo.....	56
Tabela 3	Descrição da frequência e porcentagem do tipo histológico da lesão primária dos melanomas cutâneos estudados.....	56
Tabela 4	Descrição da frequência e porcentagem do tipo de crescimento da lesão primária dos melanomas cutâneos estudados.....	57
Tabela 5	Descrição da frequência e porcentagem do índice de Breslow (4 categorias) das lesões de melanoma cutâneo estudadas....	57
Tabela 6	Descrição da frequência e porcentagem do nível de Clark encontrado no total de melanomas cutâneos estudados.....	58
Tabela 7	Descrição da frequência e porcentagem da ulceração histológica encontrada nos casos de melanoma cutâneo estudados.....	58
Tabela 8	Descrição da frequência e porcentagem de regressão encontrada nos casos de melanoma cutâneo estudados.....	59
Tabela 9	Descrição da frequência e porcentagem em relação ao estágio dos pacientes com melanoma cutâneo estudados.....	59

Tabela 10	Descrição da média e mediana dos anticorpos utilizados para o total de casos marcados.....	60
Tabela 11	Descrição da média e mediana do escore combinado dos anticorpos estudados em relação ao tipo de lesão (nevo comum, nevo atípico e melanoma cutâneo). Os valores das medianas estão em vermelho.....	61
Tabela 12	Valores medianos da expressão dos marcadores de acordo com o tipo de lesão.....	64
Tabela 13	Descrição da média e mediana do escore combinado dos anticorpos estudados em relação ao índice de Breslow em 3 categorias. Os valores das medianas estão em vermelho.....	65
Tabela 14	Valores medianos da expressão dos marcadores de acordo com a espessura em milímetros (mm) do melanoma cutâneo (Breslow). Os valores estatisticamente significativos estão em vermelho.....	67
Tabela 15	Descrição da média e mediana do escore combinado dos anticorpos estudados em relação ao estadiamento em 3 categorias. Os valores das medianas estão em vermelho.....	68
Tabela 16	Valores medianos da expressão dos marcadores de acordo com o estadiamento dos pacientes com melanoma cutâneo em 3 categorias (estádio I, II e III/IV). Os valores estatisticamente significativos estão em vermelho.....	70
Tabela 17	Valores medianos da expressão dos marcadores de acordo com o status linfonodal. Os valores estatisticamente significativos estão em vermelho.....	72
Tabela 18	Correlação entre a expressão das proteínas estudadas.....	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Fatores de risco clínicos para o desenvolvimento do melanoma cutâneo.....	16
Quadro 2	Classificação TNM do Melanoma.....	43
Quadro 3	Estadiamento clínico e patológico do Melanoma.....	44
Quadro 4	Anticorpos utilizados no protocolo de reações 1.....	48
Quadro 5	Anticorpos utilizados no protocolo de reações 2.....	50
Quadro 6	Descrição das proteínas (estudadas) envolvidas na adesão e comunicação celular.....	77

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A estrutura da Pele	1
1.2	A biologia e desenvolvimento dos Melanócitos	3
1.3	A unidade de pigmentação – interação entre melanócitos e ceratinócitos	5
1.4	Os nevos melanocíticos	8
1.5	A origem e incidência do Melanoma Cutâneo	11
1.6	Fatores de risco para o desenvolvimento do Melanoma Cutâneo	12
1.6.1	Fatores Ambientais	12
1.6.2	Fatores Constitucionais	13
1.6.3	Fatores Genéticos	15
1.6.4	Imunoistoquímica	16
1.7	Modelo de progressão do Melanoma	17
1.8	O estudo do câncer por meio do <i>tissue microarray</i> (TMA)	19
1.9	Utilização do TMA no estudo do modelo de progressão do Melanoma	21
1.10	A utilização da técnica de microarranjos de CDNA no estudo do modelo de progressão do melanoma	22
1.11	Utilização do TMA no estudo do modelo de Progressão do Melanoma	23
1.11.1	Desmocolina 3 (Dsc3)	24
1.11.2	Calicreinas (KLK)	27
1.11.3	Citoceratina 5 (CK5)	31
1.11.4	cx43	33
2	JUSTIFICATIVA	34
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivos gerais	36

3.2	Objetivos específicos	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Casuística	37
4.2	Critérios de Inclusão	38
4.3	Análise Histológica	39
4.3.1	Confecção do TMA	44
4.3.2	Imunoistoquímica	46
4.3.3	Leitura das lâminas	52
4.4	Análise estatística	53
5	RESULTADOS	55
5.1	Descrição das variáveis do estudo	55
5.2	Comparação entre o tipo de lesão (nevo comum, nevo atípico e melanoma cutâneo) e a expressão dos anticorpos estudados	60
5.3	Comparação entre o índice de Breslow e a expressão dos anticorpos estudados nas lesões de melanoma cutâneo	64
5.4	Comparação entre o estadiamento e a expressão dos anticorpos estudados nas lesões de melanoma cutâneo	68
5.5	Comparação entre o <i>status</i> linfonodal e a expressão dos anticorpos estudados nas lesões de melanoma cutâneo	71
5.6	Estudo da correlação entre a expressão dos marcadores biomoleculares	72
6	DISCUSSÃO	75
6.1	Correlação entre a expressão dos marcadores biomoleculares	99
7	CONCLUSÕES	100
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, serve de revestimento para separar o meio interno do ambiente externo, constituindo uma barreira protetora dos tecidos mais profundos contra a ação dos agentes físicos (raios ultra-violetas), químicos e bacterianos. Desempenha importante função de regular a temperatura por meio da transpiração ou vasoconstricção. A pele é também um órgão dos sentidos, uma vez que suas extremidades nervosas reagem à dor, ao calor, ao frio, ao tato e à pressão e é o responsável pelo fornecimento da vitamina (CHU et al. 2003).

1.1 A ESTRUTURA DA PELE

A epiderme é um epitélio escamoso estratificado ceratinizado, que se renova continuamente e origina estruturas denominadas apêndices epidérmicos (unidades pilo-sebáceas, unhas e glândulas sudoríparas). Tem aproximadamente 0,4 a 1,5mm de espessura (epiderme) enquanto a espessura total da pele (epiderme e derme) pode variar de 1,5 a 4mm (dependendo da região anatômica).

Os ceratinócitos são as células que compõem a maior parte da epiderme e estão organizados em quatro camadas (basal, espinhosa, granulosa e córnea). As células migram da camada basal para a superfície

externa, para formar camadas progressivamente diferenciadas (ceratinizadas) (CHU et al. 2003).

Entre os ceratinócitos da epiderme existem células chamadas imigrantes, que são compostas por melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Os melanócitos e as células de Langerhans migram para a epiderme durante o desenvolvimento embrionário. As células de Merkel (receptor tátil) provavelmente se diferenciam *in situ*. Outras células, como os linfócitos, são habitantes transitórios e raros da pele (CHU et al. 2003).

A junção dermo-epidérmica é a zona da membrana basal que forma a interface entre a epiderme e a derme. A sua principal função é resistir às forças mecânicas externas, sustentar a epiderme, determinar a polaridade de seu crescimento, organizar o citoesqueleto das células basais, produzir sinais durante o desenvolvimento e funcionar como barreira semi-permeável. A estrutura da membrana basal é quase toda produzida pelos ceratinócitos, com mínima contribuição dos fibroblastos da derme (CHU et al. 2003).

A junção dermo-epidérmica pode ser dividida em três compartimentos: filamentos de ancoragem (hemi-desmossomos), que se ligam aos ceratinócitos basais, a lâmina densa (formada principalmente por colágeno tipo IV) e a sub-lâmina densa formada pelas fibrilas de ancoragem (colágeno tipo VII).

A derme é um sistema integrado de fibras, filamentos e tecido conectivo amorfo que aloja nervos, vasos, apêndices epidérmicos, fibroblastos, macrófagos, mastócitos e outras células como linfócitos, plasmócitos e leucócitos provenientes do sangue, em resposta à diferentes

estímulos. É responsável pela elasticidade e flexibilidade da pele, promove proteção mecânica, ajuda na termorregulação, e possui receptores sensoriais. A derme está organizada em duas regiões, a derme papilar e a derme reticular (CHU et al. 2003).

A derme papilar se localiza logo abaixo da membrana basal e é formada por fibrilas de colágeno de pequeno diâmetro e fibras elásticas oxitalânicas. Possui alta densidade de fibroblastos que se proliferam rapidamente, tem alta atividade metabólica e produz diferentes tipos de proteoglicanas, comparada com a derme reticular (CHU et al. 2003).

A derme reticular se localiza abaixo da derme papilar e é composta por fibrilas de colágeno de grande diâmetro que estão organizadas em grandes feixes e existe uma maior abundância de fibras elásticas. A transição entre a derme papilar e reticular é marcada pela presença do plexo vascular superficial, denominada derme intermediária, onde há maior presença de fibroblastos e células inflamatórias, em relação à derme reticular profunda (CHU et al. 2003)..

1.2 A BIOLOGIA E DESENVOLVIMENTO DOS MELANÓCITOS

Os melanócitos são as células responsáveis pela produção de melanina, que determina a cor da pele, cabelos e olhos. Estas células exercem efeitos biológicos significativos que variam desde conseqüências comportamentais de importância cosmética até o câncer cutâneo mais devastador, o melanoma.

As células precursoras dos melanócitos são os melanoblastos de origem neuroectodérmica. Os melanoblastos primários estão localizados na crista neural, se proliferam e dão origem aos melanócitos secundários. Após um dia de proliferação, os melanoblastos precursores dão origem aos melanoblastos terciários, que começam a migrar dorso-lateralmente, duas ou três semanas após a fertilização (LARUE et al. 2003). Os melanoblastos terciários atravessam a membrana basal que separa a derme da epiderme, invadem a epiderme e permanecem em contato com a membrana basal, sendo chamados de melanoblastos quaternários. Os melanoblastos quaternários se diferenciam em melanócitos epidérmicos, onde permanecem quiescentes, apesar de seu potencial proliferativo (LARUE et al. 2003; CHAMMAS et al. 2003).

Durante o desenvolvimento, o primeiro fator de transcrição que parece estar envolvido na transição das células precursoras em melanoblastos é denominado *Microphthalmia - associated transcription factor* (Mitf). A interação do receptor de membrana celular C-Kit com seu ligante *Steel factor* resulta na fosforilação de Mitf, mediada pela ativação da via de MAPKinase, além do recrutamento seletivo de CPB/p300, que são fatores transcricionais co-ativadores. A fosforilação de Mitf ativa a transcrição de um conjunto de genes que regulam a proliferação e diferenciação dos melanoblastos em melanócitos na epiderme. Alguns estudos sugerem que Mitf além de ter um papel importante na diferenciação (pigmentação), também está envolvido nos processos de proliferação e sobrevivência durante o desenvolvimento dos melanócitos (WIDLUND e FISHER 2003). O aumento da expressão de

Mitf na maioria das lesões de melanoma primários, incluindo os não pigmentados, sugere sua possível utilização na realização do diagnóstico deste tipo de câncer (WIDLUND et al. 2002).

A proteína Wnt também está envolvida na diferenciação dos melanoblastos em melanócitos por meio da ativação do receptor Frizzled. Esta ativação resulta na inativação de GSK3 e conseqüente aumento de β -catenina no citoplasma, que migra para o núcleo, ativando os fatores de transcrição Tcf/Lef, levando à ativação de um grupo de genes (c-Myc, Ciclina D1 e Mitf), responsável pela proliferação e diferenciação celular (WIDLUND et al. 2002; PHAM et al. 2003).

A regulação dos níveis de β -catenina é feita pelo complexo protéico formado por GSK3 β , Axina e APC, que determina o nível de ubiquitinação e posterior degradação de β -catenina. A existência de mutação nos genes que codificam as proteínas do complexo protéico (GSK3, Axina e APC) que levam ao aumento de β -catenina de localização nuclear, tem sido descrita no melanoma. No núcleo, a β -catenina interage com os fatores de transcrição TCF/Lef, levando à ativação de genes com atividade mitogênica (WIDLUND et al. 2002; LARUE et al. 2003; HALABAN et al. 2003).

1.3 A UNIDADE DE PIGMENTAÇÃO – INTERAÇÃO ENTRE MELANÓCITOS E CERATINÓCITOS

Após a diferenciação do melanoblasto em melanócito, que ocorre na epiderme, este permanece aderido à membrana basal, intercalado por 5 a 8

queratinócitos basais. Na epiderme, os melanócitos interagem com múltiplos ceratinócitos (aproximadamente 35-40 ceratinócitos), formando as unidades de pigmentação. Por meio das expansões dendríticas dos melanócitos ocorre a transferência dos melanossomos (organelas contendo melanina) para os ceratinócitos, no processo de pigmentação epidérmica (LI e HERLYN 2000).

A radiação ultra-violeta induz ao dano celular, levando à formação de dímeros de pirimidina, resultando em alterações estruturais do DNA (mutações). Além disto, a radiação ultra-violeta leva à proliferação dos melanócitos pela indução de fatores de crescimento celular produzidos por ceratinócitos e fibroblastos (bFGF, HGF/SF e ET1). Por tudo isso, a exposição solar excessiva precoce pode manifestar-se tardiamente em transformação maligna dos melanócitos (WIDLUND et al. 2002). A melanina tem papel importante na defesa natural da pele contra os efeitos deletérios da radiação solar ultra-violeta. A radiação UV (ultra-violeta) ativa a proliferação dos melanócitos, a produção de melanina e a transferência dos melanossomas para os ceratinócitos epidérmicos (HALABAN et al. 2003).

Os melanossomas ricos em melanina são translocados dos melanócitos para os ceratinócitos por meio dos prolongamentos dendríticos, mecanismo ainda não totalmente elucidado (BOISSY 2003). Três métodos de transferência foram propostos: o primeiro mecanismo envolve secreção do conteúdo melanossomal do melanócito para o espaço intercelular e endocitose pelos ceratinócitos epidérmicos; o segundo modelo propõe uma fusão direta das membranas plasmáticas dos melanócitos e ceratinócitos

(necessitando da presença da proteína SNARE); e o terceiro modelo propõe que a região distal do prolongamento dendrítico dos melanócitos sejam fagocitados pelos ceratinócitos (HALABAN et al. 2003).

Independente do mecanismo de transferência dos melanossomas dos melanócitos para os ceratinócitos, estas células estão em comunicação. A adesão entre melanócitos e ceratinócitos ocorre principalmente por meio da interação das moléculas de E-caderina, presentes nas junções aderentes tanto de melanócitos como de ceratinócitos (LI e HERLYN 2000). O estado não-proliferativo dos melanócitos, nas unidades de pigmentação, parece justificar-se pelo contato célula-célula entre melanócitos e ceratinócitos (inibição por contato). Os melanócitos normais quando presentes na derme, deixam de expressar E-caderina e passam a expressar N-caderina (HSU et al. 2000; CHAMMAS et al. 2003).

Na adesão célula-célula, as moléculas de β -catenina são recrutadas pelas moléculas de E-caderina na formação dos desmossomos, assim, a substituição de E-caderina por N-caderina também contribuiria para o aumento do pool citoplasmático de β -catenina que, na ausência de degradação adequada poderia migrar para o núcleo e estimular a proliferação, por meio da ativação de fatores transcricionais nucleares Tcf/Lef (LI e HERLYN 2000; LARUE et al. 2003).

1.4 OS NEVOS MELANOCÍTICOS

Os nevos melanocíticos adquiridos são formados por células pigmentadas que possuem características comuns aos melanócitos, mas apresentam uma diferenciação alterada que leva à proliferação, formação de ninhos e capacidade de invasão da derme (GONTIER et al. 2004). As células melanocíticas névicas são mais arredondadas, perdem seus dendritos e acumulam pigmentação. Os nevos comuns são subdivididos histologicamente em nevos juncionais (células névicas na junção dermo-epidérmica), compostos (células névicas na junção dermo-epidérmica e derme) e intradérmicos (células névicas na derme) seguindo seu ciclo de vida natural (MAITRA et al. 2002).

A teoria “Abtropfung” surgiu para explicar a formação do compartimento dérmico dos nevos melanocíticos. Unna, em 1893, propôs que as células névicas se originam na epiderme e posteriormente migram para a derme (WORRET e BURGDORF 1998; GONTIER et al. 2004).

Os nevos comuns aparecem na infância, seu número está relacionado a fatores genéticos (tipo de pele) e fatores ambientais (exposição UV). Os nevos parecem estar ativos (proliferação e diferenciação) durante a infância e adolescência e tornam-se estáveis nos adultos. A monitorização das lesões névicas por meio da dermatoscopia digital confirma que, a presença de alterações das características dermatoscópicas (por exemplo, aparecimento de glóbulos periféricos), é mais comum em indivíduos até 20 anos (KITTLER 2007).

GONTIER et al. (2004) realizaram estudos com reconstrução tridimensional da pele, utilizando nevos congênitos e verificaram a diminuição da expressão de E-caderina nas células névicas da derme e re-expressão de E-caderina quando as células do nevo congênito eram implantadas na epiderme. Este estudo contribuiu com a hipótese de que as células pigmentadas perdem o controle negativo dos ceratinócitos quando estão na derme e são capazes de proliferar, formando o compartimento dérmico dos nevos (GONTIER et al. 2004).

A presença de muitos nevos adquiridos (nevos comuns e nevos atípicos) é um marcador de risco para o desenvolvimento do melanoma cutâneo. Acredita-se também que os nevos melanocíticos comuns adquiridos e os nevos atípicos sejam lesões precursoras do melanoma cutâneo. A maior evidência a favor desta teoria é a associação entre nevos e melanomas observadas clínica e histologicamente. A presença clínica de nevos na região do melanoma já foi descrita entre 19% e 85% e a associação histológica entre nevos e melanomas variou de 4% a 72%. (SKENDER-KALNENAS 1995) Estudos realizados com indivíduos com nevos displásicos, revelaram que os melanomas surgiram em contigüidade histológica com os nevos atípicos em 44 a 80% (NAEYAERT e BROCHEZ 2003).

Os nevos atípicos são caracterizados clinicamente por lesões maculares com cinco milímetros ou mais de diâmetro, geralmente com bordas irregulares ou indefinidas e múltiplas cores. A síndrome do nevo atípico é caracterizada pela presença de pelo menos um nevo atípico clínico

e mais de cinquenta nevos melanocíticos (comuns ou atípicos), de acordo com a classificação do NIH Consensus Conference (NAEYAERT e BROCHEZ 2003).

Em relação aos nevos atípicos, a presença de características clínicas de atipia se correlaciona imperfeitamente com a presença de displasia histológica. Em um estudo envolvendo 101 pacientes com melanoma esporádico, a lesão clínica mais atípica foi removida cirurgicamente e a presença de displasia foi verificada histologicamente em 7% dos casos nos quais as lesões apresentavam apenas uma característica clínica de displasia, 23% nos casos com duas características clínicas de atipia e 62% nos casos com três delas (NAEYAERT e BROCHEZ 2003).

O nevo atípico pode ser confundido com o melanoma tanto clinicamente como histopatologicamente. Em um estudo realizado por BROCHEZ et al. em (2002), um grupo de lesões histologicamente diagnosticadas como nevos atípicos por patologistas experientes foram diagnosticadas como melanomas e por outro grupo (de patologistas) em 21% dos casos, os melanomas *in situ* e finos foram diagnosticados como nevos atípicos em 12% dos casos (NAEYAERT e BROCHEZ 2003).

O diagnóstico histológico do nevo atípico é baseado na identificação de anormalidades citológicas e arquiteturais específicas e atualmente não existe um critério que seja universalmente aceito. O diagnóstico baseado em critérios maiores e menores é o mais utilizado. Os critérios maiores são: proliferação de nevomelanócitos atípicos na região da membrana basal se estendendo por três cristas epidérmicas em relação ao componente

intradérmico e proliferação melanocítica intraepidérmica (lentiginosa ou epitelióide). Os critérios menores são: fibrose concêntrica eosinofílica envolvendo as cristas epidérmicas ou fibroplasia lamelar, neovascularização, resposta inflamatória dérmica e fusão de cristas. O diagnóstico é realizado se houver 2 critérios maiores e pelo menos 2 critérios menores (NAEYAERT e BROCHEZ 2003).

1.5 A ORIGEM E INCIDÊNCIA DO MELANOMA CUTÂNEO

O melanoma é uma neoplasia de comportamento biológico muito agressivo, originada dos melanócitos que estão localizados na camada basal da epiderme, infundíbulo e região bulbar dos folículos pilosos, na coróide e leptomeninges.

A incidência do melanoma tem dobrado, mundialmente, em pacientes de pele clara, nos últimos dez anos (LORENTZEN et al. 1999). A maior taxa de incidência e mortalidade mundial se encontra na Austrália. Neste país, é o câncer mais comum em homens e o segundo em mulheres, na faixa etária de 15 a 44 anos, sendo considerado um problema de saúde pública (MARKS 2002).

No Brasil, dados do Instituto Nacional de Câncer - INCA revelam uma incidência global de melanoma variando de zero a 8,73 por 100.000 habitantes, sendo estimados 5820 novos casos para o ano 2005, com a maior taxa de incidência no Estado de Santa Catarina (Ministério da Saúde 2004). Pode-se observar que a incidência desta neoplasia dobrou em

Florianópolis e Porto Alegre entre 2003 e 2005, dados considerados alarmantes, devido ao curto espaço de tempo decorrido. Considerando-se estes fatos, é provável que o melanoma seja sub-notificado. O Hospital AC Camargo de São Paulo tem sido referência no tratamento do melanoma e o número de casos novos tratados por ano é de aproximadamente 200 pacientes (dados não publicados).

O melanoma cutâneo é uma neoplasia que acomete os jovens, apresenta alta agressividade e é refratária aos tratamentos atuais quando há o desenvolvimento de metástases (SLOMINSKI et al. 1998a, b; SHEN et al. 2003). A cura do melanoma cutâneo está relacionada com a excisão do tumor em sua fase inicial de desenvolvimento e está bem estabelecida a necessidade do diagnóstico precoce (LANGLEY et al. 1999).

1.6 FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DO MELANOMA CUTÂNEO

Os fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma cutâneo podem ser caracterizados como ambientais, constitucionais, genéticos e outros.

1.6.1 Fatores Ambientais

A radiação ultra-violeta (RUV) foi identificada como o fator de risco ambiental mais importante para o desenvolvimento do câncer da pele (KENNEDY et al. 2003). A RUV promove alterações na pele por seu efeito

mutagênico no DNA, estimulando a produção de fatores de crescimento, reduzindo a imunidade local e promovendo espécies de oxigênio reativo que resulta em dano do DNA e supressão da apoptose, levando à carcinogênese (EL-DEIRY 2007; RÜNGER e KAPPES 2008). Os ácidos nucléicos absorvem diretamente a radiação UVB, promovendo a formação de dímeros de pirimidina e fotoprodutos que resultam em mutação no DNA (EL-DEIRY 2007; RÜNGER e KAPPES 2008) e carcinogênese. Existe também a absorção indireta da radiação UVA por outros cromóforos, como moléculas de oxigênio, gerando oxigênio reativo que levam ao dano do DNA e conseqüente efeito mutagênico e carcinogênico (RÜNGER e KAPPES 2008).

A história pessoal de queimaduras solares dolorosas ocorridas até os 20 anos de idade está associada ao desenvolvimento do melanoma cutâneo (KENNEDY et al. 2003). O desenvolvimento do melanoma cutâneo está associado mais à exposição solar intermitente do que à exposição solar crônica (Quadro 1). A associação entre queimadura solar e melanoma cutâneo sofre a influência da latitude, sendo que em altas latitudes o risco de desenvolvimento do melanoma é maior do que em baixas latitudes (GANDINI et al. 2005a) (Quadro 1).

1.6.2 Fatores Constitucionais

Os indivíduos que apresentam fototipos de pele I e II da classificação de Fitzpatrick apresentam risco maior de desenvolvimento do melanoma cutâneo em relação àqueles que nunca se queimam e bronzeiam com

facilidade (Quadro 1). Os indivíduos que apresentam pele clara, olhos azuis, cabelos vermelhos e muitas efélides apresentam risco aumentado de desenvolvimento do melanoma cutâneo (MARRETT et al. 1992; GANDINI et al. 2005b; LIVINGSTON et al. 2007; MAREHBIAN et al. 2007) (Quadro 1).

O número de nevos comuns e atípicos são importantes fatores de risco independentes para o desenvolvimento do melanoma cutâneo (THOMAS et al 2007). Se um indivíduo apresenta de 100 a 115 lesões névicas o risco de desenvolvimento do melanoma é de 7 a 12 vezes maior em relação a um indivíduo com apenas, no máximo, 10 a 15 nevos comuns (SKENDER-KALNENAS et al. 1995; GRULICH et al. 1996; GANDINI et al. 2005c) (Quadro 1). Para um indivíduo com 5 nevos atípicos, seu risco de desenvolvimento do melanoma cutâneo é de 6 vezes em relação a um indivíduo que não apresenta nenhuma lesão atípica (Quadro 1) (SKENDER-KALNENAS et al. 1995; GANDINI et al. 2005c).

Os pacientes com melanoma cutâneo prévio têm um risco maior de desenvolver um segundo melanoma (TUCKER et al. 1985; GRULICH et al. 1996; LEVI et al. 1997; ULIASZ e LEBWOHL 2007). O risco de desenvolvimento de um segundo melanoma primário observado por DIFRONZIO et al. (1999) foi de 2,8 em cinco anos e 3,6 em dez anos. LEVI et al. (1997) encontraram um risco de 4,7 em seguimento de vinte anos e FERRONE et al. (2005) descreveram um risco de 8,6 em seguimento de seis anos (Quadro 1).

A associação entre câncer da pele não melanoma e o aumento do risco de desenvolvimento do melanoma cutâneo é bem estabelecido.

BOWER et al. (2000) e THOMPSON et al. (2005) encontraram risco de melanoma de 2.9 em pacientes com câncer da pele não melanoma (Quadro 1).

1.6.3 Fatores Genéticos

Algumas síndromes genéticas são caracterizadas pelo desenvolvimento do melanoma cutâneo. O xeroderma pigmentoso é autossômico recessivo, caracterizado pelo surgimento precoce de ceratoses actínicas, CBCs, CECs e melanoma cutâneo. Foram identificados sete genes (XPA ao XPG) responsáveis pelo processo de reparação do DNA após dano pela RUV que podem sofrer mutação levando ao aparecimento de tumores (TSAO 2001).

Aproximadamente 10% dos melanomas são hereditários e caracterizam a síndrome do melanoma familiar (PLATZ et al. 2000). O melanoma familiar é um termo utilizado para caracterizar as famílias com um ou mais parentes de primeiro grau com diagnóstico de melanoma (GOLDSTEIN e TUCKER 1995). O melanoma familiar é uma condição genética e, até o momento, dois genes foram envolvidos, o CDKN2A e o CDK4, localizados no cromossomo 9p21. A mutação do gene supressor de tumor CDKN2A foi descrita em 20% dos melanomas familiares (KRAEMER 2003; THOMPSON et al. 2005; WANG et al. 2005). O risco de desenvolver melanoma é de 30 a 70 vezes maior em indivíduos com história familiar significativa comparada com a população geral (THOMPSON et al. 2005; ISAACSON e RAMSAY 2007) (Quadro 1).

1.6.4 Imunossupressão

Os pacientes com transplante renal, submetidos à terapia imunossupressora, apresentam risco de desenvolver o melanoma cutâneo em três vezes, se comparados com a população geral (JENSEN et al. 1999) (Quadro 1).

Os pacientes com infecção HIV apresentam risco relativo de desenvolvimento do melanoma cutâneo de 1,5 (GRULICH et al. 1999).

Quadro 1 - Fatores de risco clínicos para o desenvolvimento do melanoma cutâneo.

	Risco Relativo Melanoma Cutâneo
Fatores Constitucionais	
Tipode pele I	2,1
Efélides	2,1
Cabelos ruivos	3,6
Olhos azuis	1,5
Presença de nevos melanocíticos	
Comuns (100 – 115 lesões)	7-12
Atípicos (5 lesões)	6
História pessoal de câncer da pele	
Melanoma	8,6
Não melanoma	2,9
Fatores Genéticos	
Melanoma familiar	30-70
Fatores Ambientais	
Exposição solar intermitente	1,4
Exposição solar crônica	1,1
Queimadura solar/ Alta latitude	2,5
Queimadura solar/ Baixa latitude	1,9
Outros Fatores	
Imunossupressão	3

Fonte: Adaptada de THOMPSON et al. (2005).

1.7 MODELO DE PROGRESSÃO DO MELANOMA

CLARK et al. (1984) propuseram um modelo de desenvolvimento e progressão dos melanomas, baseado em modelos experimentais, observações clínicas e histopatológicas, composto por 6 etapas: (0): melanócito precursor; (1): nevos comuns adquiridos ou congênitos, com presença de melanócitos normais; (2) nevos displásicos, com atipia estrutural e arquitetural, sugere-se que sejam lesões precursoras de melanoma; (3) melanoma de crescimento radial, melanomas primários não-tumorigênicos sem capacidade de metastatização; (4): melanoma de crescimento vertical, melanomas primários que invadem a derme e com capacidade potencial de metastatização; (5): melanoma metastático (CLARK et al. 1984; LI e HERLYN 2000; CHAMMAS et al. 2003).

No modelo de progressão, os nevos comuns adquiridos ou congênitos são formados por células nevomelanocíticas, melanócitos de formato oval, ausência de dendritos e capacidade de formar ninhos em todas as camadas da epiderme e derme (CLARK et al. 1984).

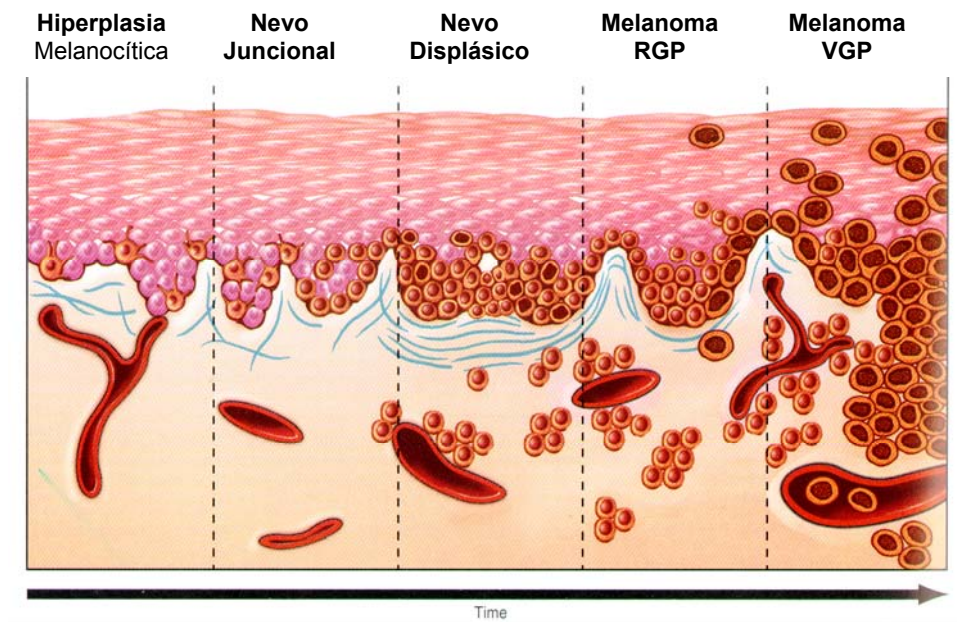
Propõe-se que o componente dérmico dos nevos compostos resulte da migração de células névicas da junção dermo-epidérmica para a derme. Na derme profunda, as células névicas sofrem o processo de diferenciação, tornando-se morfológicamente menores e sem a capacidade proliferativa (CLARK et al. 1984).

Acredita-se que a formação de nevos advindos de melanócitos maduros seja induzida pela disrupção da comunicação célula-célula entre

ceratinócitos e melanócitos, levando a um escape do melanócito ao controle regulatório do ceratinócito. Sugere-se ainda que a proliferação limitada das células névicas na derme se deva pela aparente ausência de aberrações cromossômicas (CLARK et al. 1984).

A progressão de melanócitos precursores ou nevos adquiridos comuns em nevos displásicos (ou atípicos) e melanoma de crescimento radial parece decorrer da aquisição de alterações genéticas. As células apresentam atipia citológica e arquitetural, perdem a adesão com a membrana basal sem sofrerem apoptose e modificam-se antigênicamente e suscitam uma resposta imune do hospedeiro. Na fase de crescimento radial, ocorre um crescimento celular tumoral limitado à epiderme ou com mínima invasão dérmica (CLARK et al. 1984).

Na fase de crescimento vertical, as células adquirem um comportamento proliferativo e invasivo descontrolado, iniciando o processo de angiogênese, acionamento de mecanismos de escape da resposta imune do hospedeiro, o que confere ao tumor, capacidade de metastatização (CLARK et al. 1984).



Fonte: Adaptado de CLARK et al. (1984)

Figura 1 - Modelo de progressão tumoral em melanomas.

1.8 O ESTUDO DO CÂNCER POR MEIO DO *TISSUE MICROARRAY* (TMA)

A técnica de *tissue microarray* - TMA foi descrita em 1998 por KONONEN et al. e permite a avaliação de centenas de amostras teciduais, fixadas em formalina em bloco de parafina, em uma única lâmina (RUBIN 2001; KORABIOWSKA et al. 2004). Este método para análise de expressão gênica é de extrema importância, dada a grande variedade de genes candidatos descobertos por meio da técnica de cDNA *microarray* (FRANTZ et al. 2001; RUBIN 2001). A técnica de TMA baseia-se na análise de amostras de tecidos em blocos de parafina que compõem os arquivos de

patologia. Desta forma, grande variedade de tumores, além de amostras numerosas, pode ser estudada (ALIZADEH et al. 2001; LEWIS et al. 2001; KIELHORN et al. 2003; PACIFICO et al. 2005). Mais importante ainda é o fato de que as amostras podem ter sido coletadas há vários anos, permitindo a devida análise de dados em relação ao acompanhamento e evolução clínica dos doadores dos tecidos estudados (ALIZADEH et al. 2001; BUBENDORF 2001; KIELHORN et al. 2003). A técnica de TMA baseia-se na obtenção de amostras de blocos de parafina coletadas por meio de agulha (punch) com diâmetro de 0,6; 1,0; 1,5 ou 2,0 milímetros, que são inseridas em um bloco receptor, por meio de um aparelho chamado *Tissue Microarrayer* (BUBENDORF 2001). Pode-se, assim, coletar até 700 espécimes em cada bloco receptor, com pouca mutilação do bloco de origem. O bloco receptor montado pode prover de 100 a 400 cortes de 5 a 8 micras, que podem ser analisados por meio de grande variedade de 11 sondas de DNA, RNA e proteínas (ALIZADEH et al. 2001; BUBENDORF 2001; LEWIS et al. 2001; KORABIOWSKA et al. 2004; PACIFICO et al. 2004). Pode-se, então, realizar, simultaneamente, a análise de DNA, RNA e expressão de proteínas em todos os espécimes em um único experimento e, ainda, analisar centenas de marcadores moleculares no mesmo grupo de espécimes.

1.9 UTILIZAÇÃO DO TMA NO ESTUDO DO MODELO DE PROGRESSÃO DO MELANOMA

As lesões benignas e malignas originadas dos melanócitos representam um dos melhores modelos de estudo da progressão tumoral, sendo o nevo melanocítico considerado o primeiro passo da via de progressão tumoral descrita para os melanomas (ELDER et al. 1989).

Poucos foram os trabalhos realizados com amostras de nevos e melanomas finos pela dificuldade de obtenção de amostra representativa do tumor por meio da técnica de confecção do TMA. Em um trabalho publicado por TELLEZ et al. (2007) para verificação da expressão da proteína alpha – 2 (AP – 2) e do receptor de protease ativada 1 (PAR – 1) no modelo de progressão do melanoma, na construção do TMA foram utilizadas amostras de nevos melanocíticos comuns, nevos melanocíticos atípicos, melanomas primários e melanomas metastáticos.

Como conclusão observaram que a perda da proteína AP – 2 (progressão tumoral e potencial metastático) é um evento crucial na progressão do melanoma humano e contribui para a evolução para o fenótipo metastático por meio da ativação da via de PAR – 1 (efeito mitogênico, sobrevivência e metástase) (TELLEZ et al. 2007).

Na tentativa de caracterizar a expressão das proteínas em diferentes fases do modelo de progressão tumoral nos melanomas (ciclo celular, apoptose, antígenos, fatores transcricionais, reparo do DNA e outras), ALONSO et al. (2004) estudaram 39 proteínas utilizando TMA. Foram

confeccionados seis diferentes TMAs, contendo nevos melanocíticos comuns, melanoma de crescimento radial, melanoma de crescimento vertical, melanomas nodulares e metástases de melanoma.

SIMIONATO NETO et al. (2007) utilizaram a técnica de TMA para descrever a expressão de alpha -v - beta3 integrina ($\alpha v\beta 3$) nos melanomas cutâneos. Para este estudo, os nevos melanocíticos e o melanoma fino foram analisados em cortes histológicos tradicionais e o TMA foi realizado apenas para os melanomas invasivos e metastáticos. Os resultados mostraram que a proteína $\alpha v\beta 3$ não teve impacto no comportamento tumoral, apesar de se mostrar com expressão aumentada nos melanomas *in situ*.

1.10 A UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MICROARRANJOS DE CDNA NO ESTUDO DO MODELO DE PROGRESSÃO DO MELANOMA

A tecnologia de microarranjos de cDNA permite a análise de milhares de genes em um único experimento e tem sido empregada em diversas doenças humanas, particularmente no estudo dos cânceres, com o objetivo de identificar genes envolvidos na oncogênese e progressão tumoral (KIM et al. 2002). Esta técnica está sendo utilizada em lesões melanocíticas contribuindo na identificação de genes diferencialmente expressos entre nevos, melanomas primários (SEYKORA et al. 2003) e metastáticos (HAQQ et al. 2005).

1.11 UTILIZAÇÃO DA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA (ARRAY) NO ESTUDO DO MODELO DE PROGRESSÃO DO MELANOMA REALIZADO NO HOSPITAL A.C. CAMARGO – MOTIVAÇÃO DO PRESENTE ESTUDO

Realizou-se um estudo no Laboratório de Inflamação do Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer/ Hospital A.C. Camargo por meio da técnica de microarranjos de cDNA e estudou-se o perfil de expressão gênica dos melanomas e nevos melanocíticos compostos e intradérmicos (MARTINS 2007; MUTO 2007). Houve diferenças na expressão gênica global entre nevos melanocíticos e melanomas, uma vez que as amostras puderam ser separadas por métodos de agrupamento não supervisionados. Foram identificados 510 trios classificadores capazes de distinguir as amostras com 100% de precisão. Treze módulos funcionais mostraram alterações com significância estatística entre nevo e melanoma, correspondendo a genes envolvidos com junção intercelular, comunicação e adesão celular.

Alguns genes como claudina 4, proteína *gap junction A1*, calicreína 7, desmocolina 3 e ceratina 5 encontravam-se com aumento de expressão em nevos melanocíticos, enquanto que colágeno tipo IV alfa1 e laminina 4 mostravam-se com aumento de expressão em melanomas. Foi verificado que a relação entre colágeno 4/ desmocolina 3 era >1 em melanomas cutâneos e <1 em nevos melanocíticos benignos (MUTO 2007).

Estes dados sinalizam que a interação melanócito-ceratinócito, melanócito-melanócito e melanócito-matriz extracelular pode ter um papel significativo na gênese das lesões melanocíticas e possivelmente no comportamento biológico dos melanomas.

1.11.1 Desmocolina 3 (Dsc3)

O gene que codifica a proteína desmocolina 3 está localizado no cromossomo 18 na localização 18q12.1. A proteína codificada por este gene é uma glicoproteína transmembrânica cálcio-dependente que é membro da subfamília da superfamília das caderinas. Os membros desta família desmossomal foram encontrados primariamente nas células epiteliais e são considerados proteínas adesivas e necessárias para a adesão celular e formação dos desmossomos.

A adesão célula-célula é considerada importante para o desenvolvimento e manutenção de um órgão humano. Nos tecidos celulares escamosos, a adesão celular promove a integridade do tecido para proteção do ambiente externo. A adesão celular na epiderme é mantida por duas principais estruturas de adesão: as junções aderentes e os desmossomos. As junções aderentes são formadas pelas caderinas clássicas e pelas proteínas α -catenina, β -catenina e plakoglobina e são conectadas aos microfilamentos de actina. Os desmossomos são compostos por dois tipos de caderinas desmossomais: desmogleína e desmocolina. A desmocolina 3 é considerada essencial na formação dos desmossomos, pois o seu domínio terminal citoplasmático é responsável pelo recrutamento das plakoglobinas,

desmoplakinas e inserção com as ceratinas (HANAKAWA et al. 2000). As desmocollinas 1 e 3 estão expressas apenas em epitélios estratificados escamosos. A desmocollina 1 é mais expressa na porção mais terminal e diferenciada do epitélio. A desmocollina 3 é mais expressa nas camadas mais próxima da membrana basal (OSHIRO et al. 2005).

A participação dos componentes desmosomais no câncer é enigmática e uma das mais intrigantes funções das proteínas desmosomais, relacionadas ao câncer, é a habilidade de inibir a motilidade celular (OSHIRO et al. 2005).

O gene da desmocollina 3 está expresso em tecidos normais de mama e sua expressão se mostrou diminuída nos tumores primários de mama e linhagens celulares de câncer de mama. Neste trabalho realizado por OSHIRO et al. (2005), a expressão do gene que codifica a proteína desmocollina 3 (DSC3) mostrou-se diminuída em 72% dos tumores primários de mama e 79% das linhagens celulares de câncer de mama testadas. O silenciamento de DSC3 foi relacionado a hipermetilação aberrante de citosina em 41% dos tumores primários de mama. Demonstrou-se *in vitro*, que DSC3 encontrava-se epigeneticamente silenciado, nas linhagens celulares de câncer de mama, decorrentes da hipermetilação de citosina na região promotora (OSHIRO et al. 2003, 2005).

Muitos dos espécimes de tumores primários nas quais a perda da expressão de DSC3 foi verificada, não foram associadas com a metilação da região promotora. Nestes casos, OSHIRO et al. (2003, 2005) hipotetizaram que a perda de fatores transcricionais críticos levaria à exposição das

regiões promotoras, que sofreriam a hipermetilação aberrante de citosina induzindo silenciamento da expressão gênica, semelhante à regulação epigenética dos genes. Demonstraram ainda, que DSC3 é um gene de resposta ao gene p53 uma vez que a adição de p53 selvagem é suficiente para induzir acetilação do promotor de DSC3 e induzir re-expressão de DSC3 em linhagens celulares de câncer de mama.

As caderinas desmossomais em humanos são sete, sendo três desmocolinas (DSC1-3) e quatro desmogleínas (DSG1-4). A perda da expressão das caderinas desmossomais já foi descrita em vários tipos de câncer (BIEDERMANN et al. 2005; OSHIRO et al. 2005) e a expressão aumentada destas caderinas em cultura de fibroblastos não adesivos gera adesão e inibe a invasão celular, levando à hipótese de que as proteínas desmossomais têm um papel como genes supressores de tumor (TSELEPIS et al. 1998).

KHAN et al. (2006) demonstraram pela primeira vez que a expressão de DSC2 está reduzida no câncer colorretal (o tecido colorretal normal expressa apenas DSC2) e é acompanhada pela expressão de novo das DSC1 e DSC3. As alterações no padrão de expressão das desmocolinas levaria à alteração da função dos desmossomos e reduziria a adesão entre as células epiteliais colônicas, resultando em uma propensão à proliferação celular, invasão e metástases. A substituição das isoformas da desmocolina poderia afetar a localização dos constituintes desmossomais no citoplasma, principalmente a redistribuição da plakoglobina (γ - catenina) da membrana para o citoplasma, levando à ativação da via de ativação do oncogene c-

myc. Os distúrbios da expressão das desmocolinas poderia afetar a via de sinalização de β – catenina. A desregulação de β – catenina poderia ter papel importante nas fases iniciais da tumorigênese colorretal (KHAN et al. 2006).

1.11.2 Calicreinas (KLKs)

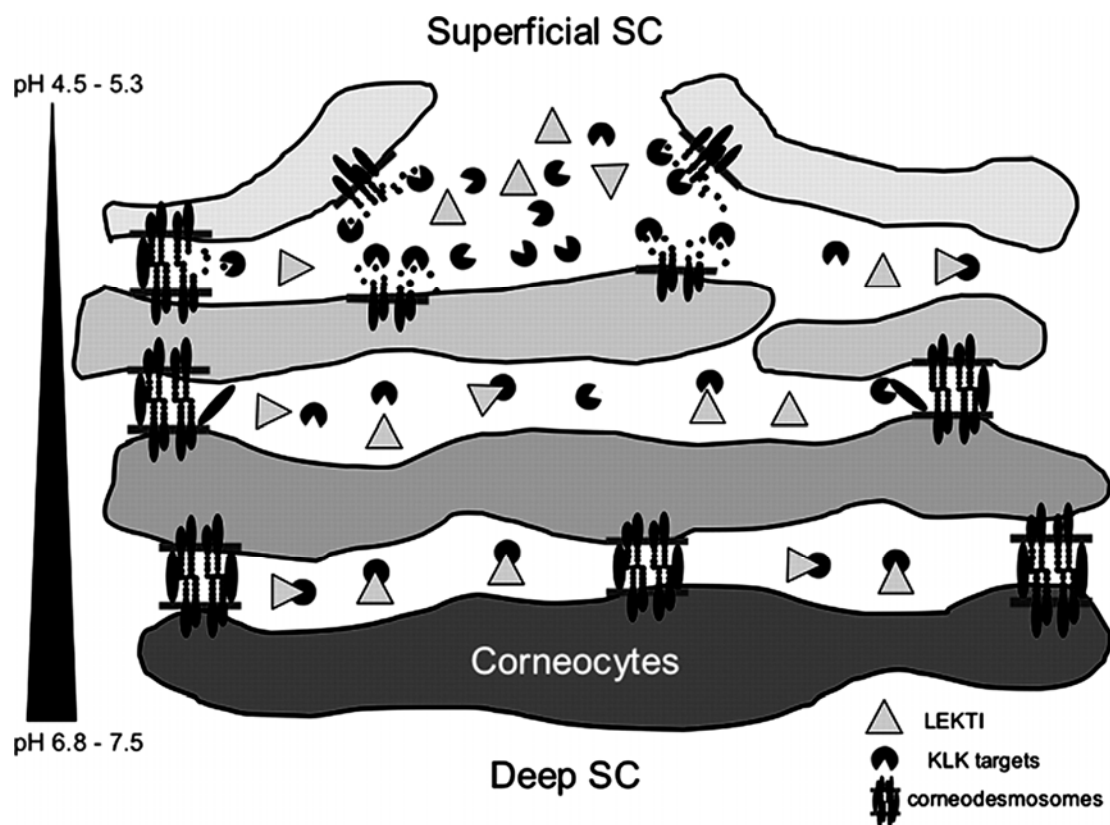
As calicreinas são um subgrupo das proteases de serina com diferentes funções fisiológicas. Muitas são as evidências que sugerem que algumas calicreinas estão envolvidas com a carcinogênese e são consideradas potenciais marcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico em diferentes neoplasias. O gene que codifica os quinze membros da subfamília das calicreinas está localizado no cromossomo 19. (PALIOURAS et al. 2007; SHAW e DIAMANDIS 2007). As calicreinas estão expressas em diferentes tecidos humanos. A expressão de KLK2, KLK3, KLK4, KLK11 e KLK15 foi verificada na próstata por meio da dosagem do RNAm. Quase todas as calicreinas foram encontradas nas glândulas salivares e alguns subgrupos foram descritos na pele (KLK1, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK9, KLK10, KLK11, KLK13 e KLK14), pâncreas (KLK1, KLK6,-13) e sistema nervoso central (KLK6, KLK7, KLK8, KLK9 e KLK14). A presença das calicreinas nos fluidos biológicos como soro, plasma seminal e leite em mulheres durante o período de amamentação confirma que são proteínas secretadas in vivo (BORGOÑO et al. 2004).

Algumas enzimas codificadas por este gene (KLK) parecem estar envolvidas com a proteólise de estruturas intercelulares de coesão que

precedem a descamação fisiológica das camadas mais superficiais da epiderme. A descamação das camadas da epiderme é um processo natural e importante para a contínua regeneração da pele. O descontrole patológico da descamação e a inflamação da pele são responsáveis pelos sintomas observados em doenças severas da pele como síndrome de Netherton (ictiose linear circunflexa), psoríase, dermatite atópica e outras. As proteínas KLK5 e KLK7 têm papel essencial nestes processos, degradando os desmossomos, que são estruturas responsáveis pela adesão célula-célula e que promovem ativação de proteínas pró-inflamatórias (EGELRUD et al. 2005)

A proteína LEKTI é reguladora do processo de descamação epidérmica por meio do controle da atividade de KLK5 e KLK7. DERAISON et al. (2007) propuseram um modelo de descamação (Figura 2) no qual o pH controla a atividade das calicreínas, regulando suas interações com LEKTI. No estrato córneo mais profundo o pH neutro permite uma grande interação entre LEKTI e as KLKs no interstício dos corneócitos, impedindo a clivagem dos corneodesmossomos. Conforme a acidificação da camada córnea mais superficial, ocorre a dissociação entre LEKTI/KLK5 e LEKTI/KLK7, permitindo a degradação dos corneodesmossomos. Nas camadas mais superficiais da camada córnea o pH é baixo suficiente para assegurar uma grande dissociação entre LEKTI e as KLKs (KLK5 e KLK7). As KLKs em pH ácido ganham atividade e degradam os componentes desmossomais como desmogleína 1, desmocolina 1 e corneodesmosina. A completa degradação

dos desmossomos leva ao despregamento dos corneócitos mais superficiais (descamação epidérmica) (CAUBET et al. 2004; DERAISON et al. 2007).



Fonte: DERAISON et al. (2007)

Figura 2 - Modelo de descamação da epiderme.

BRATTSAND et al. (2005) em um estudo *in vitro* verificaram que a KLK7 é a responsável pela maior parte da atividade proteolítica no estrato córneo. A KLK5 é ativadora da KLK7, do seu próprio precursor e o precursor da KLK14, por sua vez, a KLK14 ativa o precursor da KLK5 que resulta na ativação da KLK7. Esta cascata proteolítica descrita no processo de descamação celular provavelmente envolve outras calicreinas com baixo nível de expressão presentes na epiderme.

BORGOÑO et al. (2007) em um estudo *in vitro*, evidenciaram o envolvimento das KLK1, KLK5, KLK6 e KLK14 no processo de descamação epidérmica por meio da clivagem da desmogleína1 (componente dos desmossomos) promovida por estas proteínas.

Por meio da técnica de PCR, JOHNSON et al. (2007) encontraram o aumento da expressão de KLK7 em adenocarcinomas ductais pancreáticos em relação ao tecido pancreático normal. Baseados nas observações de que a KLK7 está envolvida com a descamação celular e tem a propriedade de clivar o domínio extracelular da proteína E-caderina diminuindo a agregação entre as células pancreáticas, propuseram que a expressão aberrante de KLK7 pode ter papel importante no desenvolvimento do câncer pancreático.

Utilizando tecido fresco congelado, SHAN et al. (2006) observaram que a proteína KLK7 se apresentava em baixas concentrações em tecido ovariano normal, em lesões benignas do ovário e tumores não ovarianos metastáticos. No câncer ovariano, entretanto, KLK7 se encontrava 10 a 15 vezes aumentada e este aumento se correlacionou com os estádios mais avançados da doença.

Em relação à KLK6, além de se mostrar envolvida com a cascata proteolítica da descamação epidérmica, foi encontrada com grande expressão em doenças do sistema nervoso central (SNC). Alguns achados laboratoriais sugeriram que a KLK6 é uma molécula mediadora inflamatória das doenças desmielinizantes do SNC (CHRISTOPHI et al. 2004).

1.11.3 Citoceratina 5 (CK5)

As citoceratinas são filamentos intermediários e estão subdivididas em duas famílias baseadas no peso molecular. O tipo I é uma subfamília composta por citoceratinas ácidas e o tipo II é composta por citoceratinas básicas. Nas células, as citoceratinas são geralmente encontradas aos pares, um de cada família. Existe uma correlação entre a complexidade do epitélio e o tamanho das subunidades expressas. Como regra, epitélios simples expressam citoceratinas de baixo peso molecular e epitélios estratificados contêm citoceratinas de alto peso molecular (RIBEIRO-SILVA et al. 2005) A relação entre os padrões de expressão das citoceratinas e o grau de diferenciação celular tem sido estudado na tentativa de reconhecer painéis de expressão de citoceratinas em diferentes neoplasias (SIGEL et al. 2001).

A proteína citoceratina 5 (CK5) é um membro da família das ceratinas cujo gene está localizado no cromossomo 12 e é uma citoceratina tipoll. A citoceratina 5 e 14 são expressas na camada basal da epiderme, ceratina 1 e 10 na camada espinhosa e ceratina 2 e 11 na camada granulosa. Na epiderme em proliferação, como por exemplo, na pasoríase ou no processo

de cicatrização epidérmica, os ceratinócitos suprabasais sintetizam citoceratinas 6 e 16 (BHAWAN et al. 2005).

Geneticamente se considera a inexistência da expressão de citoceratinas nos melanócitos e nas células da crista neural. KATAGATA et al. (1999) demonstraram a presença das subunidades de ceratina (K) K8 e K18 em cultura de células da crista neural e a presença de K1, K5, K10 e K14 em cultura de melanócitos. Observaram, através da microscopia eletrônica, que as subunidades das citoceratinas não formavam filamentos em cultura de células do melanoma. Postularam que existe uma alteração na formação dos filamentos de citoceratina durante o processo de transformação do melanócito para o melanoma.

BHAWAN et al. (2005) demonstraram a presença de K16 nos melanócitos da pele humana normal e em cultura de melanócitos, em estudo imunoistoquímico. Sugeriram que a expressão da citoceratina em melanócitos pode afetar a formação dos dendritos e sua interação com os ceratinócitos epidérmicos.

MIETTINEN e FRANSILA (1989) observaram por meio de estudo imunoistoquímico a presença de filamentos de proteínas intermediárias nos melanócitos atípicos. Concluíram que a composição do citoesqueleto dos melanomas é mais complexa do que se pensava previamente e que os melanomas contêm citoceratinas.

1.11.4 Cx43

As junções tipo fenda (*gap junctions*) são canais da membrana celular especializadas e têm a função de permitir a transferência de pequenas moléculas (<100Dalton), íons, água e nucleotídeos, que passam seletivamente de uma célula à outra. São importantes na coordenação do desenvolvimento e homeostase celular. São compostos por dois hemicanais provenientes de cada uma das células em contato, chamados de conexons. Cada conexon é composto por seis proteínas transmembrana, as conexinas. O gene da família das conexinas codifica 21 diferentes proteínas nos humanos. A conexina 43 é a mais abundante em um grande espectro de tecidos, nos epitélios, coração, útero, tecido conectivo e cérebro (TOSKO e RUCH 1998; LANGLOIS et al. 2008).

Seis subunidades da conexina 43 são oligomerizadas no aparelho de Golgi e formam o conexon (hemicanal) que, por sua vez, é transportado para a superfície celular. Na superfície celular o conexon se alinha com o conexon da célula adjacente para formar um canal. Centenas de canais se agregam em uma placa (*gap junction plaques*) (TOSKO e RUCH 1998).

2 JUSTIFICATIVA

O melanoma cutâneo é um tumor resultante das interações complexas entre os fatores genéticos, constitucionais e ambientais. Sua incidência vem aumentando mundialmente na população branca, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão e tem alta taxa de mortalidade (HALABAN 1993). Teoricamente pode se originar dos nevos melanocíticos, dentre eles os nevos atípicos (SLOMINSKI et al. 2001). O prognóstico está relacionado com a profundidade da lesão na pele sendo o diagnóstico precoce de fundamental importância. O tratamento cirúrgico nos estádios iniciais da doença, na maioria dos casos, é curativo, porém nos estádios avançados o tratamento permanece limitado uma vez que o melanoma é considerado um tumor radio e quimio-resistente (WANG et al. 1995).

Assim, justifica-se o estudo de marcadores tumorais que possam auxiliar no entendimento da origem e desenvolvimento do melanoma, do ponto de vista molecular. A caracterização da expressão alterada de genes, por meio do estudo das proteínas no processo de transformação do nevo para o melanoma poderá contribuir na identificação de lesões potenciais precursoras, que seriam caracterizadas por um fenótipo considerado de alto risco para o desenvolvimento desta neoplasia resultando no tratamento em estádios muito precoces, levando à cura ou melhorando a sobrevida dos pacientes. O estudo das proteínas também poderia contribuir para o

entendimento de vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento e progressão tumoral.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

1. Avaliar a expressão de proteínas envolvidas na junção intercelular, comunicação intercelular e adesão celular em nevos comuns, nevos atípicos, melanomas invasivos (finos e espessos) e melanoma metastático, visando contribuir para o entendimento dos processos moleculares que levam um nevo a se transformar em melanoma (Modelo de Progressão do Melanoma).
2. Validar os dados obtidos de genes diferencialmente expressos identificados por microarranjos de cDNA em pesquisas realizadas nesta instituição.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar a expressão da proteína conexina 43 (proteína gap junction), calicreina 7, calicreina 6, desmocolina 3 e keratina 5 em nevos comuns, nevos atípicos, melanomas invasivos (finos e espessos) e metástases de melanoma por meio do estudo imunohistoquímico, utilizando-se a técnica de TMA.
- 2 Avaliar a correlação entre as proteínas estudadas no modelo de progressão do melanoma.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram utilizadas lâminas do TMA de melanomas extensivos superficiais com Breslow maior que 1mm e metástases, confeccionado no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo para a tese de mestrado da Dra. Bianca Costa Soares de Sá contendo 111 casos (de 1994 a 2000) (SÁ 2005). Foram utilizadas lâminas do TMA de melanomas cutâneos submetidos à pesquisa do linfonodo sentinela com 67 casos, confeccionado no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo para a tese de mestrado do Dr. Christiano Horta (LIMA JUNIOR 2006). Os TMAs utilizados continham no total 27 casos de nevos comuns como controle (10 e 17 casos respectivamente).

Foram selecionados 32 casos de nevos melanocíticos comuns de pacientes que foram submetidos à exérese cirúrgica dos mesmos no período de 2003 a 2007 e 22 nevos atípicos de pacientes que foram submetidos à exérese cirúrgica no período de 2003 a 2006 para confecção de TMA de nevos comuns e atípicos.

Foram selecionados 25 casos de melanoma fino (Breslow < 1mm) de pacientes que foram submetidos à exérese cirúrgica dos mesmos no período de 2003 a 2005 para confecção de TMA de melanomas finos.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Para a confecção de todos os TMAs:

- 1 Pacientes cujo diagnóstico histopatológico (melanoma cutâneo, nevo atípico e nevo comum) tenha sido realizado no Hospital A.C. Camargo cujos blocos de parafina estavam disponíveis nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica, dispondo de material suficiente para confecção do TMA.
- 2 Pacientes cujo diagnóstico de melanoma foi realizado no Hospital A.C. Camargo submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela, com blocos de parafina disponíveis nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica e que contenham material suficiente para o estudo.
- 3 Nos pacientes em que havia metástases para estudo, foram incluídas aquelas cujos blocos de parafina estavam disponíveis nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica e que dispunham de material suficiente para confecção do TMA.
- 4 Pacientes com pelo menos 2 anos de seguimento clínico encontrado nos prontuários a partir do diagnóstico histopatológico de melanoma cutâneo.

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os preparados histológicos foram revistos e classificados de acordo com o protocolo de diagnóstico utilizado na instituição (Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo), em consonância com o consenso histopatológico proposto pelo Grupo Brasileiro de Melanoma (LANDMAN et al. 2003)

Foram avaliados os seguintes critérios:

- a. Tipo histológico: foram considerados: lentigo maligno melanoma, melanoma extensivo superficial, melanoma acral lentiginoso, melanoma nodular e outros (melanoma desmoplásico, neurotrópico, nevíde, spitzóide e verrucoso.). Sabe-se que a fase *in situ* do melanoma tem períodos variáveis de evolução para fase infiltrativa, sendo muita longa no lentigo maligno melanoma e curta no extensivo superficial e acral lentiginoso. Na fase infiltrativa alguns tipos de melanoma parecem se comportar de forma mais agressiva como o melanoma nodular.
- b. Fase de crescimento: são consideradas as fases de crescimento:
Radial: não tumorigênica; *in situ* e/ou microinvasiva, caracterizada por crescimento indolente mas progressivo. As células melanocíticas na derme não apresentam mitoses, crescimento expansivo ou necrose e estão isoladas ou em pequenos grupamentos.
Vertical: invasiva, caracterizada por crescimento infiltrativo da derme, com alto grau de atipia nuclear, mitoses, invasão dos tecidos

adjacentes e necrose. Em lesões pouco espessas utiliza-se três critérios: a) ninhos dérmicos maiores que os epidérmicos; b) qualquer mitose dérmica; c) ninhos de qualquer tamanho com crescimento expansivo nítido, comprimindo a derme adjacente.

- c. Nível de Clark: determinado pelos cinco níveis definidos por CLARK et al. (1969). São eles:

Nível I: limitação das células de melanoma à epiderme e seus apêndices.

Nível II: extensão à derme papilar com poucas células de melanoma estendendo-se à interface entre a derme papilar e a reticular.

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

Nível IV: invasão da derme reticular.

Nível V: invasão da tela subcutânea.

- d. Profundidade segundo BRESLOW (1970): Esta medida determina o volume da neoplasia e correlaciona-se diretamente com a profundidade de infiltração do tumor. É expressa em milímetros e determinada a partir da camada granulosa até a célula neoplásica mais profunda encontrada. A espessura do tumor é considerada o fator prognóstico isolado mais importante nos pacientes com melanoma localizado (estádios I e II) (BALCH et al. 2001a). O limite de 1 mm define os melanomas finos e de bom prognóstico e o estadiamento, determinado pelo *American Joint Committee on*

Cancer, define para a categoria T (tumor) os limites de 1.0, 2.0 e 4.0mm (BALCH et al. 2001a) (Quadro1).

- e. Índice mitótico: avaliado em lesões em fase vertical de crescimento, na área de maior concentração de mitoses, e, equivale a quantidade de mitoses em aproximadamente 1mm^2 (10 campos de grande aumento na objetiva de 40x). O índice mitótico é também considerado um importante fator prognóstico nos pacientes com melanoma e em alguns estudos até com maior significância que a ulceração, mas estes dados ainda são controversos, principalmente pelo uso de diferentes métodos de mensuração nos diversos estudos sobre o tema (AZZOLA et al. 2003; BUSAM 2004; FRANCKEN et al. 2004; BARNHILL et al. 2005; NAGORE et al. 2005).
- f. Ulceração: é definida como solução de continuidade da epiderme, substituída por tampão fibrino-leucocitário sobre a lesão primária, em decorrência da infiltração neoplásica (BALCH et al. 2001b). A ulceração é o segundo fator prognóstico mais importante nos melanomas localizados (estádios I e II) (BALCH et al. 2001a e b). Nos melanomas em estágio III, é a característica histológica de pior prognóstico do tumor primário (BALCH et al. 2001a e b). Nos melanomas com espessura acima de 1 mm é considerada o fator preditivo mais significativo, representando maior risco de desenvolvimento de metástases (BALCH et al. 2001a e b). 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 et al. 2001a e b) (Quadros 1 e 2).

- g. Regressão: é definida como uma área, dentro do melanoma, onde há ausência de células neoplásicas na epiderme e na derme, substituídas por tecido fibroso e aumento da vascularização, podendo ser encontrados linfócitos e melanófagos (CLARK et al. 1989). As opiniões entre os autores são controversas em relação à associação entre regressão e pior prognóstico do tumor (BLESSING et al. 1990). A regressão é encontrada em cerca de 1/3 dos casos de melanoma. Ao contrário do que se esperaria, o encontro de regressão tem sido associado a um pior prognóstico, possivelmente indicando que a neoplasia antes do processo regressivo estaria a uma profundidade maior do que a atualmente encontrada, portanto com evolução mais reservada. Outra explicação possível indica que o sistema imune reconheceria clones selecionados de células neoplásicas, destruindo-os, o que por outro lado selecionaria clones resistentes à resposta imune do hospedeiro (TRAU et al. 1983; CLARK et al. 1989).

Quadro 2 - Classificação TNM do Melanoma, segundo *American Joint Committee on Cancer, 2002*.

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

Fonte: Adaptado de BALCH et al. (2001b)

Quadro 3 - Estadiamento clínico e patológico do Melanoma, segundo *American Joint Committee on Cancer, 2002*.

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

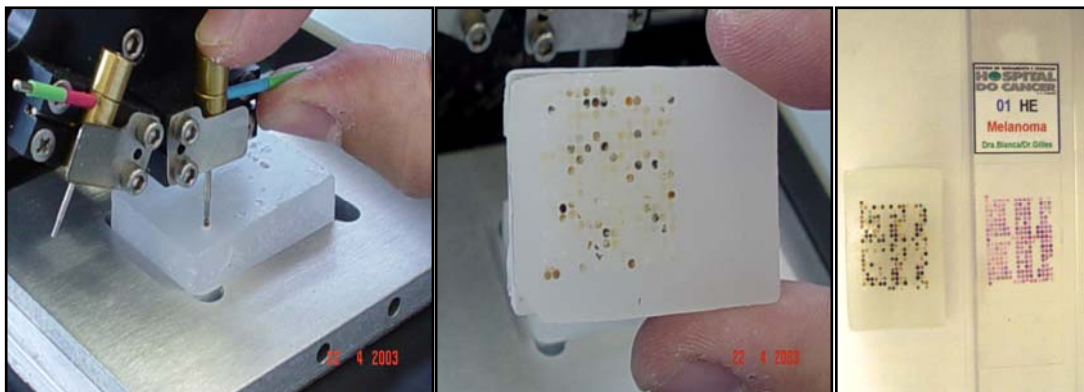
*estadiamento clínico inclui microestadiamento do melanoma primário e avaliação clínica e radiológica para metástases.
+estadiamento patológico inclui microestadiamento do melanoma primário e informações patológicas a respeito dos linfonodos regionais após linfadenectomia parcial ou completa.

Fonte: Adaptado de BALCH et al. (2001b)

4.3.1 Confecção do TMA

A partir da lâmina original corada com Hematoxilina Eosina (H&E) as áreas de tumor foram marcadas com caneta e 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 por meio do uso do equipamento disponível no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer: *tissue microarrayer* (Beecher Instruments ®, Silver Spring, EUA) (Figura 3).



Legenda: À esquerda ilustração da técnica necessária para a confecção do TMA. Ao meio o bloco de TMA já confeccionado. À direita o bloco de TMA e uma lâmina corada em H&E.

Figura 3 – A confecção do TMA

Os blocos de TMA foram confeccionados com cilindros, em duplicata, de um milímetro (*tissue microarrayer punch* MP10-1,0 mm) de diâmetro de amostras do tumor (melanomas cutâneos), em duplicata (dois cores de cada caso). Foram incluídas amostras de nevos melanocíticos como controle das reações. Foi adicionado um cilindro de tecido hepático para orientação inicial de cada seqüência dos casos utilizados.

A mesma técnica foi utilizada para a realização do TMA de nevos comuns e nevos atípicos e o TMA de melanoma fino. Este último foi realizado em triplicata (3 cores de cada caso) para maior representatividade do tecido.

Confecção das lâminas de vidro a partir dos TMAs de melanoma invasivo e melanoma invasivo com LNS positivo.

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

As lâminas 01, 10, 40, 60, 80 e 100 foram coradas com Hematoxilina e Eosina para controle da representatividade do material. Duas lâminas distando 10 cortes entre si foram utilizadas para reação de imunoistoquímica para os marcadores acima mencionados. Por meio de uma planilha realizada em Excel® (Windows® – Microsoft® office) é possível localizar cada caso nas lâminas do TMA.

A partir dos blocos dos TMAs de nevos e melanomas finos foram preparados 50 cortes histológicos com espessura de 5 µm e as lâminas 1, 25 e 40 foram coradas com Hematoxilina e Eosina para controle da representatividade do material. As lâminas de 1 a 39 foram preparadas utilizando-se o método da fita adesiva (*tape*) e as lâminas 40 a 50 foram preparadas pelo método tradicional (Figura 3)

4.3.2 Imunoistoquímica

As reações imunoistoquímicas foram realizadas nas lâminas dos TMAs confeccionados (melanomas invasivos e nevos melanocíticos) utilizando-se os protocolos de reação padrão. Para os anticorpos desmocolina 3, citoceratina 5 e conexina 3 foi utilizado o *permanent red* na tentativa de diminuir a interferência da melanina na leitura dos marcadores.

Protocolo de Reações 1:

- 1- Desparafinização dos cortes das lâminas adesivas de TMA (Instrumedics-Hackensack NJ, EUA) e hidratação dos cortes histológicos: 3 banhos em Xilol, 4 banhos de álcool, água corrente;
- 2- Recuperação antigênica por calor, em câmara de pressão controlada por microprocessador (PASCAL);
- 3- Lavagem em água corrente por 5 minutos; água destilada;
- 4- Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3%, com 3 trocas de 5 minutos cada;
- 5- Lavagem em água corrente por 5 minutos; água destilada
- 6- Bloqueio de proteínas: 20 minutos com Bloqueador de Proteínas (DAKO) em câmara úmida à temperatura ambiente;
- 7- Retirar excesso do bloqueador;
- 8- Incubação do anticorpo primário em câmara úmida por 2 horas à temperatura ambiente com diluições pré-estabelecidas para cada anticorpo (Quadro 1);
- 9- Lavagem em PBS: 3 trocas de 5 minutos cada;
- 10- Incubação anticorpo secundário biotilado (LSAB, DAKO) por 20 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente;
- 11- Lavagem em PBS: 3 trocas de 5 minutos cada;
- 12- Incubação com complexo streptoavidina-peroxidase(LSAB, DAKO) por 20 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente;
- 13- Lavagem em PBS: 3 trocas de 5 minutos cada;

- 14- Revelação da reação com cromógeno diaminobenzidine (DAB): 5 minutos: Kit Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia);
- 15- Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- 16- Contracoloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos;
- 17- Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- 18- Desidratação em álcool, Xilol, montagem da lâminas com entellan (Merck 7961);
- 19- Leitura em microscópio óptico comum.

Quadro 4 - Anticorpos utilizados no protocolo de reações 1.

Anticorpo	Diluição	Marca	Clone	Recuperação antigênia	Amplificação
Calicreina 7	1/200	R&D Systems	policlonal	Pascal Citrato pH 6,0	LSAB- HRP
Calicreina 6	1/50	R&D Systems	policlonal	Pascal Citrato pH 6,0	LSAB -HRP

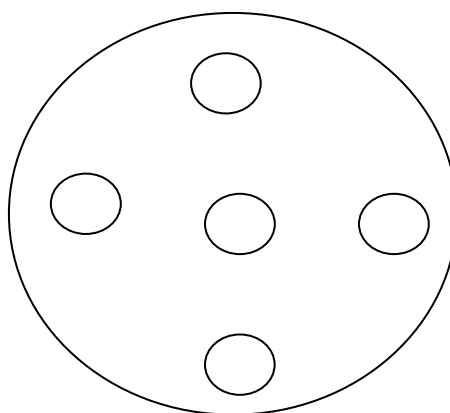
Protocolo de Reações 2:

- 1- Desparafinização e hidratação dos cortes histológicos: 3 banhos em Xilol (5 minutos cada), 4 banhos de álcool, lavagem por 5 minutos em água corrente;
- 2- Recuperação antigênica na Pascal (Câmara de Pressão) em solução Citrato pH 6,0 à 125° C (30 segundos após atingir 125°C e pressão entre 20 e 25 psi).
- 3- Lavagem em água corrente por 5 minutos;

- 4- Bloqueio da peroxidase endógena: 3 banhos de 5 minutos cada com Peróxido de Hidrogênio 10 volumes;
- 5- Lavagem em PBS;
- 6- Bloqueio de proteínas: 20 minutos com Bloqueador de Proteínas (DAKO);
- 7- Incubação do anticorpo primário por 2 horas à temperatura ambiente (diluição pré-estabelecida) (Quadro 1);
- 8- Lavagem em PBS;
- 9- Incubação com anticorpo secundário (LINK) (Envision G/2 System/AP) (DAKO) por 30 minutos à temperatura ambiente;
- 10- Lavagem em PBS;
- 11- Incubação com polímero conjugado com Fosfatase alcalina (Envision G/2 System/AP) (DAKO);
- 12- Lavagem em PBS;
- 13- Revelação da reação com solução de cromógeno Permanent Red/Levamisole (Tampão, Permanent Red, levamisole) por 15 minutos à temperatura ambiente;
- 14- Lavagem em PBS;
- 15- Lavagem em água destilada;
- 16- Contracoloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto;
- 17- Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- 18- Lavagem em água destilada;
- 19- Secar e montar em meio permanente.

Quadro 5 - Anticorpos utilizados no protocolo de reações 2.

Anticorpo	Diluição	Marca	Clone	Recuperação	amplificação
Connexin 43	1/100	Zymed	Policlonal	Pascal/Citrato pH6,0	Envision G/2 System/AP
Citoceratina 5	1/200	Thermo Scientific	XM26	Pascal/Citrato pH6,0	Envision G/2 System/AP
Desmocollin 3	Kit pronto p/uso	Biodesign International	Dsc3-U114	Pascal/Citrato pH6,0	Envision G/2 System/AP

**Figura 4** - Esquema da marcação em cruz (utilizando-se a circunferência em cruz de 40X) utilizada para cada amostra do TMA.

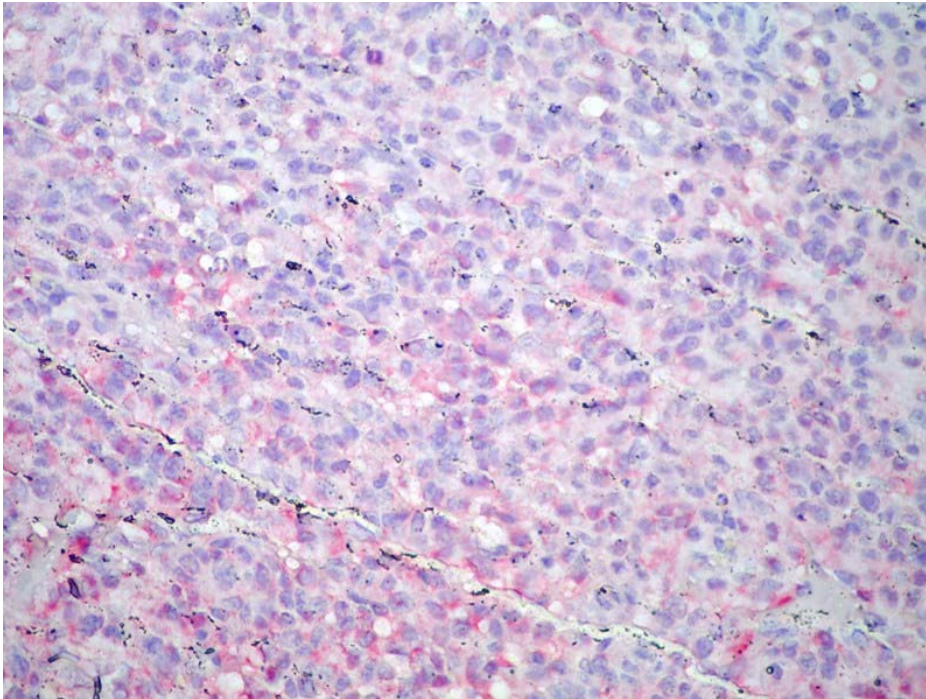


Figura 5 - Exemplo de menor expressão na membrana celular (imunohistoquímica de Cx43 em células do melanoma cutâneo, Microfotografia 400X).

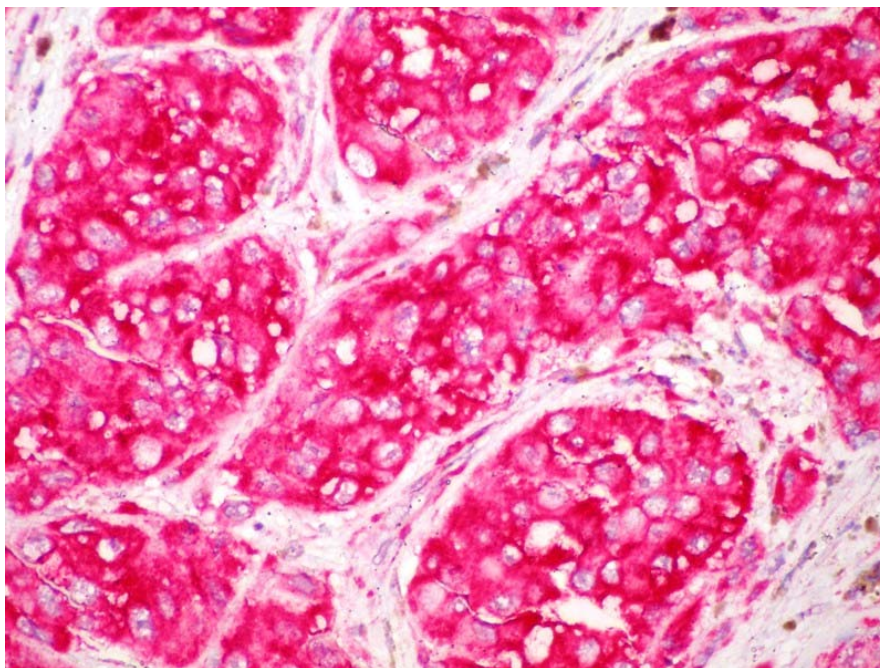


Figura 6 - Exemplo de maior expressão na membrana celular (imunohistoquímica de Cx43 em células do melanoma cutâneo, Microfotografia 400X).

4.3.3 Leitura das lâminas

As lâminas de TMA foram analisadas por meio da microscopia digital realizada com o programa ACIS III (*Automated Cellular Imaging System-ChromaVision Medical Systems®*, San Juan Capistrano Califórnia – Estados Unido da América). Este programa identifica as células de interesse por meio da detecção de cores características produzidas pelas reações de imunohistoquímica de rotina. Mais de 150 parâmetros morfométricos são utilizados para avaliar as células alvo. Algumas de suas características são: sensibilidade e acurácia, avaliação em quantidade e com boa reprodutibilidade e as avaliações podem ser arquivadas permanentemente.

As amostras consideradas válidas para análise por meio da microscopia digital foram aquelas que apresentavam pelo menos vinte e cinco por cento do tecido tumoral representado. Para cada amostra (core) foram selecionadas cinco áreas com maior celularidade (*hot spots*), distribuídas em cruz (vide esquema), utilizando-se a circunferência de 40X (recurso disponível no programa ACIS III). Quando a amostra não permitia a distribuição em cruz, as circunferências de 40X eram marcadas aleatoriamente nas áreas de maior celularidade (*hot spots*). Na marcação dos nevos atípicos utilizou-se a circunferência de 60X pois a área de maior celularidade dos melanócitos atípicos se encontrava na junção dermo-epidérmica e na tentativa de reduzir a contaminação por ceratinócitos marcados adjacentes, optou-se pela menor área.

Para a avaliação da expressão do anticorpo em cada caso estudado por meio da microscopia digital (ACIS) foi utilizado um escore que foi chamado de escore combinado (EC), devido à utilização os parâmetros de intensidade e quantidade de área marcada. A definição de EC é a multiplicação da intensidade pela área estudada, sendo a área definida como a área marrom dividida a soma da área marrom com azul (HES et al. 2007; KANEHIRA et al. 2008).

$$\text{EC} = \text{Intensidade} \times \% \text{Área marcada}$$

$$\% \text{Área marcada} = \frac{\text{Área Marrom}}{\text{Área Azul} + \text{Área Marrom}}$$

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizado para verificar a aderência à normalidade da expressão dos marcadores biomoleculares. Como nenhum dos marcadores respeitou uma distribuição gaussiana, optou-se pela utilização de testes não paramétricos.

Empregaram-se os testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis para comparar os valores medianos de expressão dos marcadores biomoleculares, respectivamente entre dois grupos e três grupos não pareados. Para avaliação *post hoc* (comparações múltiplas dois a dois)

utilizou-se o teste de Tukey HSD. Avaliou-se a correlação entre os marcadores biomoleculares por meio do coeficiente de Spearman.

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

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS DO ESTUDO

O total de lesões estudadas foi de 272 lesões sendo 59 (21,7%) nevos comuns, 22 (8,1%) nevos atípicos, 162 (89,3%) melanomas cutâneos 34 (12,5%) melanomas finos (<1mm), 92 (33,8%) intermediários (1,01 - 4,0mm) e 36 (>4mm) espessos) e 29 (10,7%) metástases.

Tabela 1 - Descrição da frequência e porcentagem dos tipos de lesão em relação ao total de lesões estudadas.

	Frequência	Porcentagem
Nevo	59	21,7
Nevo atípico	22	8,1
Melanoma fino (<= 1 mm)	34	12,5
Melanoma intermediário (1,01 - 4,0 mm)	92	33,8
Melanoma espesso (> 4 mm)	36	13,2
Metástases	29	10,7
Total	272	100,0

A idade média dos pacientes ao diagnóstico de melanoma cutâneo foi de 54,40 anos e mediana de 54 anos. A média da mensuração do índice de Breslow foi de 3,04 mm e mediana de 1,87mm. A média do índice mitótico foi de 5,88CGA e mediana de 3,00 campos de grande aumento.

Tabela 2 - Descrição da média e mediana da idade ao diagnóstico, índice de Breslow, índice mitótico, número de linfonodos sentinelas positivos e número de linfonodos sentinelas encontrados para os casos de melanoma cutâneo.

	Idade ao diagnóstico (anos)	Breslow (mm)	Índice mitótico (CGA)
Total de casos	162	162	162
Média	54,40	3,0454	5,88
Mediana	54,00	1,8700	3,00

Mm: Milímetros. LNS: Linfonodo sentinela. CGA: Campos de grande aumento.

A grande maioria dos melanomas cutâneos estudados era do tipo extensivo superficial com 132 (81,48%) lesões. Seis (3,7%) casos eram do tipo nodular, 17 (10,49%) eram do tipo acral lentiginoso e 7 (4,32%) do tipo não classificável.

Tabela 3 - Descrição da frequência e porcentagem do tipo histológico da lesão primária dos melanomas cutâneos estudados.

	Frequência	Porcentagem
Extensivo superficial	132	81,48
Nodular	6	3,7
Acral lentiginoso	17	10,49
Não classificável	7	4,32
Total	162	100,0

Em relação ao tipo de crescimento da lesão nos melanomas cutâneos, houve predominância do crescimento vertical em relação ao crescimento radial, o primeiro com 158 (97,5%) casos e o segundo com apenas 4 (2,5%) casos.

Tabela 4 - Descrição da frequência e porcentagem do tipo de crescimento da lesão primária dos melanomas cutâneos estudados.

	Frequência	Porcentagem
Vertical	158	97,5
Radial	4	2,5
Total	162	100,0

Havia 34 (21%) lesões de melanoma com índice de Breslow menor que 1mm, 49 (30,2%) lesões com 1,01 a 2,00mm, 43 (26,5%) lesões com 2,01 a 4,00mm e 36 (22,2%) lesões com índice de Breslow maior que 4mm.

Tabela 5 - Descrição da frequência e porcentagem do índice de Breslow (4 categorias) das lesões de melanoma cutâneo estudadas.

	Frequência	Porcentagem
Até 1 mm	34	21,0
1,01 - 2,00 mm	49	30,2
2,01 - 4,00 mm	43	26,5
> 4 mm	36	22,2
Total	162	100,0

Mm: milímetros.

O nível de Clark foi avaliado nas lesões de melanoma cutâneo e 1 (0,6%) lesão apresentava nível 1, 8 (4,9%) lesões nível 2, 91 (56,2%) lesões nível 3, 45 (27,8%) lesões nível 4 e 17 (10,5%) lesões nível 5.

Tabela 6 - Descrição da frequência e porcentagem do nível de Clark encontrado no total de melanomas cutâneos estudados.

	Frequência	Porcentagem
Nível 1	1	,6
Nível 2	8	4,9
Nível 3	91	56,2
Nível 4	45	27,8
Nível 5	17	10,5
Total	162	100,0

Na avaliação da ulceração histológica nas lesões de melanoma cutâneo, 49 (30,2%) lesões apresentavam ulceração e 113 (69,8%) não apresentavam.

Tabela 7 - Descrição da frequência e porcentagem da ulceração histológica encontrada nos casos de melanoma cutâneo estudados.

	Frequência	Porcentagem
Presença de ulceração	49	30,2
Ausência de ulceração	113	69,8
Total	162	100,0

Na avaliação da presença de regressão histológica na lesão primária de melanoma cutâneo, 30 (18,5%) lesões apresentavam regressão e 132 (81,5%) não apresentavam.

Tabela 8 - Descrição da frequência e porcentagem de regressão encontrada nos casos de melanoma cutâneo estudados.

	Frequência	Porcentagem
Presença de regressão	30	18,5
Ausência de regressão	132	81,5
Total	162	100,0

A pesquisa do linfonodo sentinela foi realizada em 113 (69,8%) dos casos de melanoma cutâneo. A metástase linfonodal ocorreu em 83 (51,23%) casos de melanoma cutâneo, a metástase em pele em 17 (10,5%) e visceral em 17 (10,5%) casos.

No estadiamento final para os casos de melanoma cutâneo estudados, 70 (43,2%) pacientes apresentavam estágio I, 74 (27,2%) estágio II e 18 (11,1%) estágios III e IV.

Tabela 9 - Descrição da frequência e porcentagem em relação ao estágio dos pacientes com melanoma cutâneo estudados.

	Frequência	Porcentagem
Estádio 1	70	43,2
Estádio 2	74	45,7
Estádios 3 / 4	18	11,1
Total	162	100,0

Em relação aos anticorpos estudados, foram avaliadas as médias e medianas da marcação de cada um deles para o total de lesões estudadas, vide Tabela X.

Tabela 10 - Descrição da média e mediana dos anticorpos utilizados para o total de casos marcados.

	CK5 Score combinado	Cx 43 Score combinado	DSC 3 Score combinado	KLK6 Score combinado	KLK7 Score combinado
Total de casos marcados	213	227	231	217	231
Média	33,1795	44,5159	19,7793	6,8985	24,3257
Mediana	9,2743	41,1816	16,1319	2,1273	17,6121

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE O TIPO DE LESÃO (NEVO COMUM, NEVO ATÍPICO E MELANOMA CUTÂNEO) E A EXPRESSÃO DOS ANTICORPOS ESTUDADOS

As medianas do escore combinado (Tabela 11) em relação ao tipo de lesão estudada foi obtida para a realização do estudo da correlação entre elas e a expressão dos anticorpos (CK5, Cx43, DSC3, KLK6 e KLK7).

Tabela 11 - Descrição da média e mediana do escore combinado dos anticorpos estudados em relação ao tipo de lesão (nevo comum, nevo atípico e melanoma cutâneo). Os valores das medianas estão em vermelho.

Tipo lesão		CK5 Score combinado	Cx 43 Score combinado	DSC 3 Score combinado	KLK6 Score combinado	KLK7 Score combinado
Nevo	N	45	43	47	46	48
	Média	5,5381	16,7020	2,9328	,6057	4,9670
	Mediana	1,9217	12,7998	,1579	,0594	1,3850
Nevo atípico	N	11	17	17	15	17
	Média	77,3388	20,1604	3,1302	3,6719	46,6206
	Mediana	79,7345	18,2395	2,3759	,4800	39,7313
Melanoma	N	132	141	141	129	139
	Média	31,0949	54,2878	25,6873	8,9487	27,8776
	Mediana	19,3077	56,2688	22,4588	4,3951	23,1054
Total	N	188	201	205	190	204
	Média	27,6834	43,3607	18,5998	6,5123	24,0488
	Mediana	10,5523	40,8991	15,1224	1,6981	16,5828

N: Total de casos.

- **CK5**

A CK5 apresentou-se com expressão aumentada nos nevos atípicos em relação aos nevos comuns e ao melanoma cutâneo, assim como a expressão desta proteína apresentou expressão aumentada nos melanomas cutâneos em relação aos nevos comuns, realizando-se o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,001$). Na avaliação pelo teste de Tukey corroborou-se o achado anterior com $p < 0,001$ (Tabela 12).

- **Cx43**

A CX43 mostrou aumento de expressão nos melanomas cutâneos em relação aos nevos comuns e nevos atípicos e os nevos atípicos apresentaram aumento da expressão em relação aos nevos comuns,

utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,001$). Na avaliação pelo teste de Tukey o aumento de expressão verificado nas lesões de melanoma cutâneo em relação aos nevos comuns e nevos atípicos foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$). O aumento de expressão dos nevos atípicos em relação aos nevos comuns não apresentou significado estatístico ($p = 0,878$) (Tabela 12).

- **DSC3**

Houve um aumento de expressão de DSC3 nos melanomas cutâneos em relação aos nevos atípicos e nevos comuns pelo teste de Kruskal-Wallis e aumento de expressão dos nevos atípicos em relação aos nevos comuns ($p < 0,001$). Na avaliação pelo teste de Tukey o aumento de expressão dos melanomas em relação aos nevos atípicos e nevos comuns apresentou significância estatística ($p < 0,001$), porém o aumento de expressão dos nevos atípicos em relação aos nevos comuns não apresentou a mesma significância ($p = 0,999$) (Tabela 12).

- **KLK6**

A KLK6 apresentou aumento de expressão nas lesões de melanoma cutâneo em relação aos nevos atípicos e nevos comuns e houve aumento de expressão desta proteína nos nevos atípicos em relação aos nevos comuns pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,001$). Na avaliação pelo teste de Tukey houve significância estatística no aumento de expressão verificado

nas lesões de melanoma cutâneo em relação aos nevos atípicos e nevos comuns ($p < 0,001$) (Tabela 12).

- **KLK7**

A proteína KLK7 apresentou maior expressão nas lesões de nevo atípico em relação aos nevos comuns e melanoma cutâneo, o melanoma cutâneo apresentou maior expressão em relação aos nevos comuns pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,001$). Utilizando-se o teste de Tukey, verificou-se maior expressão dos nevos atípicos em relação aos nevos comuns e melanomas cutâneos e maior de expressão nos melanomas cutâneos em relação aos nevos comuns com valores estatisticamente significativos ($p < 0,001$ e $p = 0,001$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores medianos da expressão dos marcadores de acordo com o tipo de lesão.

Marcador	Lesão	n	Mediana	Teste de Kruskal-Wallis (valor de P)	Avaliação <i>post-hoc</i> pelo teste de Tukey HSD (valor de P)		
					Nevo	Nevo atípico	Melanoma
Citoceratina 5	Nevo	45	1,9	< 0,001	NA	< 0,001	< 0,001
	Nevo atípico	11	79,7		< 0,001	NA	< 0,001
	Melanoma	132	19,3		< 0,001	< 0,001	NA
Conexina 43	Nevo	43	12,8	< 0,001	NA	0,878	< 0,001
	Nevo atípico	17	18,2		0,878	NA	< 0,001
	Melanoma	141	56,3		< 0,001	< 0,001	NA
Desmocolina 3	Nevo	47	0,2	< 0,001	NA	0,999	< 0,001
	Nevo atípico	17	2,4		0,999	NA	< 0,001
	Melanoma	141	22,5		< 0,001	< 0,001	NA
Calicreina 6	Nevo	46	0,1	< 0,001	NA	0,518	< 0,001
	Nevo atípico	15	0,5		0,518	NA	0,102
	Melanoma	129	4,4		< 0,001	0,102	NA
Calicreina 7	Nevo	48	1,4	< 0,001	NA	< 0,001	< 0,001
	Nevo atípico	17	39,7		< 0,001	NA	0,001
	Melanoma	139	23,1		< 0,001	0,001	NA

NA: Não se aplica. n: Total de casos.

5.3 COMPARAÇÃO ENTRE O ÍNDICE DE BRESLOW E A EXPRESSÃO DOS ANTICORPOS ESTUDADOS NAS LESÕES DE MELANOMA CUTÂNEO

Foi realizada a comparação entre o índice de Breslow em 3 categorias (<1mm, 1,01 – 4,00mm e >4mm) e a marcação dos anticorpos CK5, Cx43, DSC3, KLK6 e KLK7 por meio da mediana do escore combinado (Tabela 13) obtido na avaliação (microscopia digital) das lesões de melanoma cutâneo.

Tabela 13 - Descrição da média e mediana do escore combinado dos anticorpos estudados em relação ao índice de Breslow em 3 categorias. Os valores das medianas estão em vermelho.

Breslow (3 categorias)		CK5 Score combinado (SC)	Cx43 Score combinado	DSC 3 Score combinado	KLK6 Score combinado	KLK7 Score combinado
Até 1mm	N	28	28	32	24	28
	Média	60,6685	57,7064	27,7382	5,9774	37,5099
	Mediana	73,1159	56,9642	25,6155	1,0740	39,4369
1,01 - 4,00 mm	N	72	78	74	69	76
	Média	22,1500	50,2388	25,0729	9,7536	27,4439
	Mediana	10,6295	52,5596	21,0083	5,8885	20,0852
> 4 mm	N	32	35	35	36	35
	Média	25,3441	60,5765	25,1112	9,3871	21,1134
	Mediana	10,5523	60,3492	25,2277	4,0258	15,4237
Total	N	132	141	141	129	139
	Média	31,0949	54,2878	25,6873	8,9487	27,8776
	Mediana	19,3077	56,2688	22,4588	4,3951	23,1054

N: Total de casos.

• CK5

Em relação aos grupos estudados (<1mm, 1,01 – 4,00mm e >4mm), foi possível verificar-se maior expressão de CK5 nos melanomas finos (<1mm) em relação aos melanomas intermediários (1,01 – 4,00mm) e espessos (>4mm). Esta diferença foi estatisticamente significativa utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,001$). Na avaliação pelo teste de Tukey comprovou-se que houve maior expressão de CK5 nos melanomas finos em relação aos melanomas intermediários ($p < 0,001$) e em relação aos melanomas espessos ($p < 0,001$), porém na análise entre os melanomas intermediários e espessos que apresentavam mediana do escore combinado de 10,6 não houve diferença estatística ($p = 0,846$) (Tabela 14).

- **Cx43**

Em relação à proteína Cx43 o teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferenças significativas entre o escore combinado para os melanomas finos, intermediários e espessos (Tabela 14).

- **DSC3**

Em relação à proteína DSC3 o teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferenças significativas entre o escore combinado para os melanomas finos, intermediários e espessos (Tabela 14).

- **KLK6**

A KLK6 apresentou diferenças de expressão entre os grupos estudados no teste de Kruskal-Wallis ($p=0,032$). A expressão dos melanomas intermediários foi maior que a expressão dos melanomas finos e melanomas espessos e a expressão dos melanomas espessos foi maior que a dos melanomas finos. Na realização do teste de Tukey não houve diferença estatística significativa entre os grupos (Tabela 14).

- **KLK7**

A expressão de KLK7 nos melanomas finos foi maior que a expressão verificada nos melanomas intermediários e espessos ($p=0,05$). A expressão desta proteína foi maior nos melanomas intermediários em relação aos melanomas espessos ($p=0,05$). O teste de Tukey comprovou a maior

expressão nos melanomas finos em relação aos melanomas espessos (p=0,014) (Tabela 14).

Tabela 14 - Valores medianos da expressão dos marcadores de acordo com a espessura em milímetros (mm) do melanoma cutâneo (Breslow). Os valores estatisticamente significativos estão em vermelho.

Marcador	Espessura do melanoma em mm (Breslow)	N	Mediana	Teste de Kruskal-Wallis (valor de P)	Avaliação <i>post-hoc</i> pelo teste de Tukey HSD (valor de P)		
					Até 1,00 mm	1,01 – 4,00 mm	> 4,00 mm
Citoceratina 5	Até 1,00 mm	28	73,1	< 0,001	NA	< 0,001	< 0,001
	1,01 – 4,00 mm	72	10,6		< 0,001	NA	0,846
	> 4,00 mm	32	10,6		< 0,001	0,846	NA
Conexina 43	Até 1,00 mm	28	57,0	0,188	NA	NA	NA
	1,01 – 4,00 mm	72	52,6		NA	NA	NA
	> 4,00 mm	37	60,3		NA	NA	NA
Desmocolina 3	Até 1,00 mm	32	25,6	0,687	NA	NA	NA
	1,01 – 4,00 mm	74	21,0		NA	NA	NA
	> 4,00 mm	35	25,2		NA	NA	NA
Calicreina 6	Até 1,00 mm	24	1,1	0,032	NA	0,334	0,484
	1,01 – 4,00 mm	69	5,9		0,334	NA	0,986
	> 4,00 mm	36	4,0		0,484	0,986	NA
Calicreina 7	Até 1,00 mm	28	39,4	0,005	NA	0,113	0,014
	1,01 – 4,00 mm	76	20,1		0,113	NA	0,359
	> 4,00 mm	35	15,4		0,014	0,359	NA

NA: Não se aplica. N: Total de casos.

5.4 COMPARAÇÃO ENTRE O ESTADIAMENTO E A EXPRESSÃO DOS ANTICORPOS ESTUDADOS NAS LESÕES DE MELANOMA CUTÂNEO

Foi realizado o estudo de comparação entre as medianas dos escores combinados dos diferentes marcadores (CK5, Cx43, DSC, KLK6 e KLK7) nas lesões de melanoma cutâneo e o estadiamento (Tabela 15).

Tabela 15 - Descrição da média e mediana do escore combinado dos anticorpos estudados em relação ao estadiamento em 3 categorias. Os valores das medianas estão em vermelho.

Estadiamento final (3 categorias)		CK5 Score combinado (SC)	CON 43 Score combinado	DSC 3 Score combinado	KLK6 Score combinado	KLK7 Score combinado
Estádio 1	N	53	57	57	47	55
	Média	42,7067	50,3988	25,8937	8,0876	34,2332
	Mediana	48,2568	48,6615	21,5237	3,9808	33,4194
Estádio 2	N	63	70	68	65	67
	Média	25,3884	58,3854	24,6903	10,1129	24,2851
	Mediana	13,4426	60,5634	20,9439	5,5547	15,9590
Estádios 3 - 4	N	16	14	16	17	17
	Média	15,1005	49,6339	29,1895	6,8787	21,4738
	Mediana	2,3900	54,8560	25,9807	3,0925	14,0288
Total	N	132	141	141	129	139
	Média	31,0949	54,2878	25,6873	8,9487	27,8776
	Mediana	19,3077	56,2688	22,4588	4,3951	23,1054

N: Total de casos.

- **CK5**

A CK5 apresentou maior expressão nos pacientes estágio I em relação aos pacientes de estágio II e III/IV e nos pacientes de estágio II houve maior expressão em relação aos pacientes de estágio III pelo teste de

Kruskal-Wallis ($p=0,002$). Na avaliação pelo teste de Tukey, houve maior expressão de CK5 no estágio I em relação aos estádios II e III/IV ($p=0,006$ e $p=0,004$) (Tabela 16).

- **Cx43**

A comparação entre a mediana dos escores combinados nos estádios I, II e III/IV e a proteína conexina 43 não apresentou valores estatisticamente significativos pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0,197$) (Tabela 16).

- **DSC3**

A comparação entre a mediana dos escores combinados nos estádios I, II e III/IV e a proteína desmocolina 3 não apresentou valores estatisticamente significativos pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0,667$) (Tabela 16).

- **KLK6**

A comparação entre a mediana dos escores combinados nos estádios I, II e III/IV e a proteína KLK6 não apresentou valores estatisticamente significativos pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0,485$) (Tabela 16).

- **KLK7**

A calicreina 7 apresentou-se com maior expressão nos pacientes com estágio I em relação aos pacientes estágio II e III/IV e houve maior sua expressão nos pacientes estágio II em relação aos pacientes estágio III/IV

pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0,007$). Na avaliação pelo teste de Tukey, a maior expressão da KLK7 ocorreu nos pacientes estágio I em relação aos pacientes estágio II foi estatisticamente significativa ($p=0,045$) (Tabela 16).

Tabela 16 - Valores medianos da expressão dos marcadores de acordo com o estadiamento dos pacientes com melanoma cutâneo em 3 categorias (estádio I, II e III/IV). Os valores estatisticamente significativos estão em vermelho.

Marcador	Estadiamento	n	Mediana	Teste de Kruskal-Wallis (valor de P)	Avaliação <i>post-hoc</i> pelo teste de Tukey HSD (valor de P)		
					Estádio I	Estádio II	Estádios III e IV
Citoceratina 5	Estádio I	53	48,3	0,002	--	0,006	0,004
	Estádio II	63	13,4		0,006	--	0,434
	Estádios III e IV	16	2,4		0,004	0,434	--
Conexina 43	Estádio I	57	48,7	0,197	NA	NA	NA
	Estádio II	70	60,6		NA	NA	NA
	Estádios III e IV	14	54,9		NA	NA	NA
Desmocolina 3	Estádio I	57	21,5	0,667	NA	NA	NA
	Estádio II	68	20,9		NA	NA	NA
	Estádios III e IV	16	26,0		NA	NA	NA
Calicreina 6	Estádio I	47	4,0	0,485	NA	NA	NA
	Estádio II	65	5,6		NA	NA	NA
	Estádios III e IV	17	3,1		NA	NA	NA
Calicreina 7	Estádio I	55	33,4	0,007	--	0,045	0,110
	Estádio II	67	16,0		0,045	--	0,892
	Estádios III e IV	17	14,0		0,110	0,892	--

NA: Não se aplica. n: Total de casos.

5.5 COMPARAÇÃO ENTRE O *STATUS* LINFONODAL E A EXPRESSÃO DOS ANTICORPOS ESTUDADOS NAS LESÕES DE MELANOMA CUTÂNEO

Para efeito estatístico, na comparação da expressão dos marcadores estudados, os dois TMA foram utilizados em conjunto, avaliando-se pacientes com e sem metástases linfonodais, não se considerando o tipo, se micro ou macrometástases.

Foi realizado o estudo comparativo entre os valores medianos dos escores combinados dos marcadores estudados (CK5, Cx43, DSC3, KLK6 e KLK7) e o *status* linfonodal dos pacientes com melanoma cutâneo por meio do teste de Mann-Whitney.

A CK5 apresentava-se com maior expressão nos pacientes com presença de metástase linfonodal ($p < 0,001$). A conexina 43 apresentava-se com maior expressão nos pacientes com metástase linfonodal ($p = 0,009$). A desmocolina apresentava-se com maior expressão nos pacientes com metástase linfonodal ($p = 0,001$). A KLK6 apresentava-se com maior expressão nos pacientes com metástase linfonodal, porém estatisticamente não significativa ($p = 0,618$). A calicreina 7 apresentou-se com maior expressão nos pacientes sem metástase linfonodal ($p = 0,005$) (Tabela 17).

Tabela 17 - Valores medianos da expressão dos marcadores de acordo com o status linfonodal. Os valores estatisticamente significativos estão em vermelho.

Marcador	Metástase linfonodal	n	Mediana	Teste de Mann-Whitney (valor de P)
Citoceratina 5	Sim	77	22,1	< 0,001
	Não	35	1,63	
Conexina 43	Sim	79	60,3	0,009
	Não	44	46,4	
Desmocolina 3	Sim	80	28,2	0,001
	Não	39	15,1	
Calicreina 6	Sim	80	6,1	0,618
	Não	35	4,0	
Calicreina 7	Sim	81	16,0	0,005
	Não	39	33,4	

n: Total de casos.

5.6 ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS MARCADORES BIOMOLECULARES

Na avaliação da correlação da expressão entre os marcadores tumorais calculado o coeficiente de Spearman (ρ). A correlação é considerada fraca se o valor de $\rho < 0,25$, regular se $0,25 < \rho < 0,50$, moderada se $0,50 < \rho < 0,75$, forte se $0,75 < \rho < 1$ e perfeita se $\rho = 1$. Todos os resultados obtidos nesta avaliação apresentaram valores positivos de ρ e foram estatisticamente significativos (Tabela 18). O valor positivo significa que na correlação entre a expressão dos marcadores se um marcador tem expressão aumentada, o outro também tem.

- **CK5**

Houve uma fraca correlação entre CK5 e Cx43 ($\rho=0,224$), CK5 e DSC3 ($\rho=0,212$) e CK5 e KLK6 ($\rho=0,248$). A correlação entre CK5 e KLK7 foi regular ($\rho=0,486$) (Tabela 18).

- **Cx43**

Houve uma fraca correlação entre a expressão de Cx43 e CK5 ($\rho=0,224$) e Cx43 e KLK7 ($\rho=0,244$). A correlação entre Cx43 e DSC3 foi moderada ($\rho=0,708$) e a correlação entre a expressão da conexina 43 e KLK6 foi regular ($\rho=0,429$) (Tabela 18).

- **DSC3**

Houve uma fraca correlação entre a expressão de DSC3 e CK5 ($\rho=0,212$) e DSC3 e KLK7 ($\rho=0,291$). A correlação entre DSC3 e Cx43 foi moderada ($\rho=0,708$) e a correlação entre DSC3 e KLK6 foi regular ($\rho=0,396$) (Tabela 18).

- **KLK6**

Houve uma fraca correlação entre a expressão de KLK6 e CK5 ($\rho=0,248$). A correlação da expressão entre KLK6 e Cx43 foi regular ($\rho=0,429$), assim como a correlação da expressão entre KLK6 e DSC3 ($\rho=0,396$). A correlação da expressão de KLK6 e KLK7 foi moderada ($\rho=0,569$) (Tabela 18).

- **KLK7**

Houve uma fraca correlação entre a expressão de KLK7 e Cx43 ($\rho=0,244$). Houve uma regular correlação entre a expressão de KLK7 e CK5 ($\rho=0,486$) e KLK7 e DSC3 ($\rho=0,291$). A correlação da expressão da KLK7 e KLK6 foi moderada ($\rho=0,569$) (Tabela18).

Tabela 18 – Correlação entre a expressão das proteínas estudadas.

Marcador		Keratina 5	Conexina 43	Desmocolina 3	Calicreina 6	Calicreina 7
Citoceratina 5	Spearman (rho)	NA	0,224	0,212	0,248	0,486
	Valor de P	NA	0,001	0,003	< 0,001	< 0,001
Conexina 43	Spearman (rho)	0,224	NA	0,708	0,429	0,244
	Valor de P	0,001	NA	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Desmocolina 3	Spearman (rho)	0,212	0,708	NA	0,396	0,291
	Valor de P	0,003	< 0,001	NA	< 0,001	< 0,001
Calicreina 6	Spearman (rho)	0,248	0,429	0,396	NA	0,569
	Valor de P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	NA	< 0,001
Calicreina 7	Spearman (rho)	0,486	0,244	0,291	0,569	NA
	Valor de P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	NA

NA: Não se aplica.

5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados foram obtidos por meio de análise de imagens digitalizadas com alta resolução, o que permitiu a identificação de modificações sutis da imunomarcação.

Utilizou-se uma padronização de identificação das áreas a serem estudadas por meio de circunferências pré-determinadas pelo programa, e que não delimitam exclusivamente o tecido contendo melanócitos (névicos ou atípicos), principalmente nas amostras de nevos atípicos onde as áreas de *hot spot* estavam localizadas junção dermo-epidérmica e não foi possível selecionar apenas os melanócitos atípicos havendo contaminação pelos ceratinócitos. Desta forma, a fim de evitar possível viés de contagem, foram escolhidas as áreas mais representativas da lesão em estudo. Além disto, como se trata de estudo comparativo entre expressões protéicas, o viés, se efetivamente presente, ocorreu em todas as amostras, diluindo a sua participação na interpretação dos resultados. Contribuiu para a melhor avaliação, o fato de que em todas as lesões, foi realizado um estudo em quadruplicata, permitindo uma melhor avaliação estatística comparativa.

Na confecção dos TMAs de nevos melanocíticos e melanomas finos houve uma dificuldade com relação à obtenção das amostras do bloco doador. Nas lesões que apresentam a epiderme íntegra o *punch* utilizado para obtenção da amostra do doador não é cortante dificultando sua

aquisição. Após afiarmos o *punch* com uma lixa delicada, não houve mais perda do material.

As funções de comunicação intercelular e adesão celular ocorrem por meio das estruturas celulares denominadas junções. As junções que mantêm o epitélio coeso, formando ligações mecânicas, são de três tipos principais: junções aderentes, desmossomos e hemidesmossomos. As junções aderentes e os desmossomos ligam uma célula epitelial à outra e os hemidesmossomos ligam a célula epitelial à lâmina basal. A junção tipo fenda (*gap junction*) permite a passagem de íons e pequenas moléculas de uma célula à outra (ALBERTS et al. 1997).

Os melanócitos não possuem hemidesmossomos verdadeiros, há estruturas especializadas que os une à lâmina basal, do tipo hemidesmossomos, estruturas pouco estudadas e denominadas de “placas densas” (TARNOWSKI 1970). As “placas densas” encontradas nos melanócitos diferem dos hemidesmossomos dos ceratinócitos basais por apresentarem filamentos menos elétrons densos convergindo para a placa à microscopia eletrônica (TARNOWSKI 1970).

As alterações em relação às proteínas estudadas, envolvidas com a adesão e comunicação celular e que fazem parte de estruturas celulares importantes (Quadro 6), poderão interferir direta ou indiretamente na comunicação de melanócitos com ceratinócitos e/ou matriz extracelular. As proteínas desmocolina 3 e citoceratina 5 estão envolvidas com a formação e manutenção dos desmossomos, hemidesmossomos e da estrutura celular. A conexina 43 é importante na formação das junções tipo fenda (*gap*

junctions). As proteínas caliceína 6 e 7 estão envolvidas com a descamação celular epidérmica.

Quadro 6 - Descrição das proteínas (estudadas) envolvidas na adesão e comunicação celular.

Estrutura celular	Proteínas envolvidas	Função
Desmossomos e hemidesmossomos	Desmocolina 3 e citoceratina 5	Adesão e estrutura celular
Junções tipo fenda	Conexina 43	Comunicação celular

- **Desmocolina 3**

O desenvolvimento do câncer é em parte caracterizado pela habilidade das células de romperem a adesão célula-célula e invadirem o tecido adjacente. A troca da E-caderina por N-caderina já foi documentada em uma variedade de tumores, incluindo as lesões melanocíticas (nevus e melanomas). Esta substituição leva à perda da adesão celular e progressão tumoral (KHAN et al. 2006).

Alterações espaciais e funcionais da interação entre melanócitos e ceratinócitos foram descritas, como a perda da associação dos melanócitos com a epiderme, capacidade proliferativa dos melanócitos e invasão da derme. Sugere-se que o fenótipo maligno do melanoma reflita um distúrbio no controle normal de vias de transdução de sinais dependentes da E-caderina dos ceratinócitos adjacentes. Alguns estudos demonstraram que a interação molecular por meio de E-caderina, entre ceratinócitos e melanócitos, induz inibição do crescimento de células de melanoma *in vitro*,

porém não existem evidências de que esta regulação negativa seja suficiente para iniciar um melanoma (LI et al. 2001).

Admite-se que a substituição de E-caderina por N-caderina permite que as células melanocíticas escapem do controle dos ceratinócitos vizinhos, conferindo às células do melanoma, demonstrada *in vitro* e *in vivo*, capacidade potencial de interação com fibroblastos N-caderina positivos da derme e células endoteliais, ou seja, adquirem novas propriedades adesivas, que facilitariam a invasão e metastatização. A substituição de E-caderina por N-caderina foi observada no processo de diferenciação e migração do melanoblasto, durante o desenvolvimento embrionário normal e nos processos de invasão e metástase, durante o desenvolvimento tumoral (LI et al. 2001).

Os nevos melanocíticos são formados por células pigmentadas com características comuns aos melanócitos, porém apresentam uma diferenciação alterada que leva à formação de ninhos e invasão dérmica (GONTIER et al. 2004). A E-caderina é considerada a maior responsável pela adesão entre os melanócitos e os ceratinócitos epidérmicos e tem importância na função e localização do melanócito na epiderme. Estudos realizados com nevos adquiridos demonstraram a fraca presença de E-caderinas em ninhos localizados na junção dermo-epidérmica (GONTIER et al. 2004). Em um estudo imunistoquímico, foi possível observar que as células dérmicas dos nevos congênitos isoladas ou em ninhos não expressavam E-caderina. Neste mesmo estudo, os autores sugeriram que a perda de E-caderina estaria envolvida com a formação de ninhos, mas não

com a migração na derme e sugeriram que possivelmente um defeito no controle dos ceratinócitos sobre os melanócitos poderia ser um evento inicial na formação dos nevos. A perda do controle dos ceratinócitos leva à proliferação e à formação do compartimento dérmico dos nevos melanocíticos (GONTIER et al. 2004).

Muitos estudos têm demonstrado que a formação das junções aderentes é pré-requisito para a formação dos desmossomos. Em estudo realizado por HANAKAWA et al. (2000), a desmocolina 3 mostrou-se estar envolvida não só com a formação dos desmossomos, mas também com as junções aderentes. A porção citoplasmática da desmocolina 3 interagia não só com a plakoglobina, mas também com a β -catenina. Assim, propuseram uma hipótese molecular para a formação dos desmossomos: o contato célula-célula se inicia com a caderina clássica (E-caderina) responsáveis pela formação das junções aderentes. Para maior estabilidade da interação célula-célula, a desmocolina 3 é recrutada como um componente inicial dos desmossomos mediado pelas junções aderentes. Este recrutamento é facilitado pela interação da desmocolina 3 com a β -catenina. Finalmente, a desmocolina 3 se posiciona no sítio de contato, recrutando outros componentes desmossomais incluindo a desmoplakina e plakoglobina. Assim, a desmocolina 3 tem papel importante na formação dos desmossomos após o estabelecimento das junções aderentes (HANAKAWA et al. 2000).

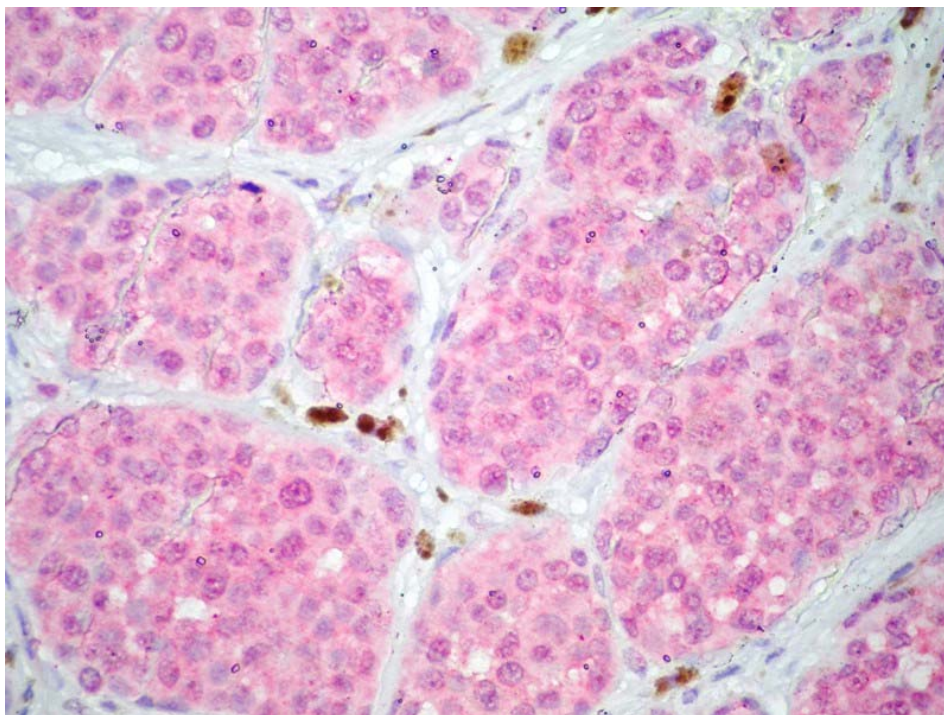
No presente estudo, o encontro da maior expressão da desmocolina 3 em melanomas em relação aos nevos comuns (Figuras 7 e 8) e atípicos

pode estar relacionado com a troca de E-caderina por N-caderina que levaria ao aumento de β -catenina citoplasmática e perda da interação entre β -catenina e a desmocolina 3 e conseqüentemente perda da adesão celular e início da nevogênese. A nossa hipótese propõe que o hemidesmossomo dos melanócitos descrito por TARNOWSKI (1970) contenha as mesmas proteínas de adesão do desmossomo, porém com estrutura diferente. A desmocolina 3, então, se apresentaria com menor expressão na fase precoce do modelo de progressão tumoral dos melanomas, ou seja, nos nevos comuns e nevos atípicos.

OSHIRO et al. (2005) demonstraram que *DSC3* é um gene de resposta ao gene p53 e que *DSC3* e p53 encontravam-se silenciados em câncer da mama. Em um estudo imunoistoquímico observaram que os melanomas com espessura acima de 1,0 mm apresentaram maior expressão de p53 nuclear, estando em concordância com dados da literatura que definem a superexpressão de p53 como sendo um evento tardio na gênese dos melanomas e estando relacionada à progressão tumoral (PIEPKORN 2000; CZAJKOWSKI et al. 2002; HUSSEIN et al. 2003; SÁ et al. (*in press*)). Considerando-se que, no trabalho de SÁ (2005), houve aumento da expressão de p53 em melanomas mais profundos, e que estes resultados foram obtidos do mesmo TMA utilizado no presente estudo, seria possível hipotetizar que na progressão dos melanomas invasivos maiores que 1 mm, o aumento da expressão do gene p53 levaria à ativação de *DSC3*, justificando-se o encontro de uma maior expressão de *DSC3* nos melanomas estudados em relação aos nevos.

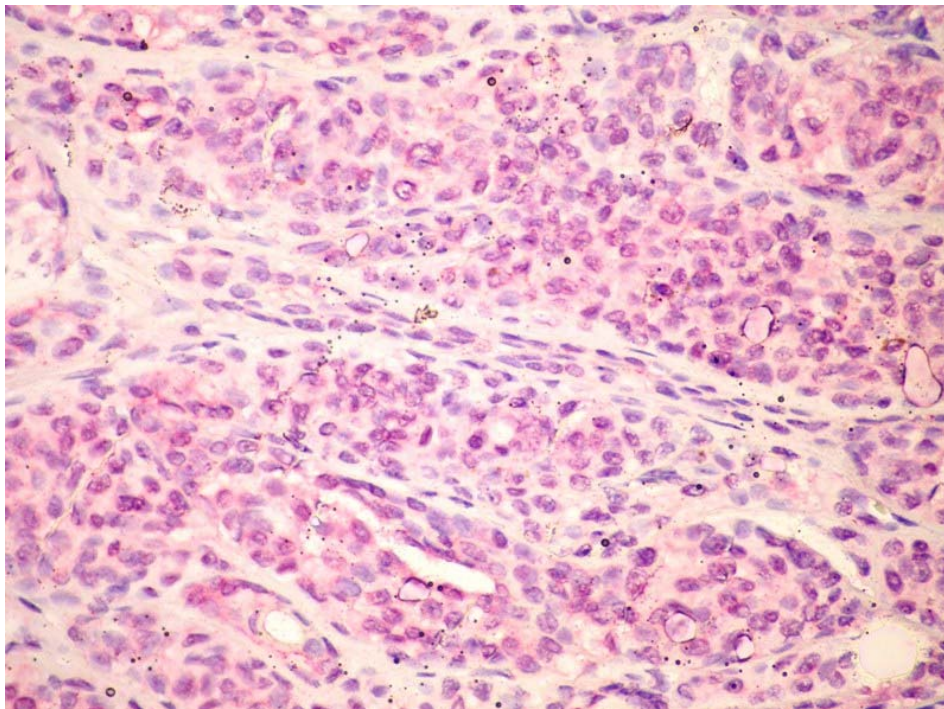
No entanto, o estudo da associação entre a expressão da desmocolina 3 e a espessura de Breslow em 3 categorias (>1mm, 1,01 – 4,00mm e >4mm), assim como no estudo de associação da expressão da desmocolina 3 e o estadiamento dos pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo, não evidenciou-se diferenças estatísticas significativas. Desta forma, a relação p53/DSC3 acima mencionada não pôde ser comprovada utilizando-se o método imunoistoquímico.

No estudo da associação entre a expressão da desmocolina 3 e o status linfonodal, a maior expressão verificada nos pacientes com metástase linfonodal em relação aos pacientes sem a presença desta corrobora a hipótese de que a maior expressão desta proteína é um evento tardio no modelo de progressão tumoral nos melanomas.



Legenda: Menor expressão de DSC3 no citoplasma (coloração rósea).

Figura 7 - Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de DSC3 em melanoma.



Legenda: Maior expressão de DSC3 no citoplasma (coloração rósea).

Figura 8 - Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de DSC3 em células névicas.

Cx43

A formação das *gap junctions* também requer a adesão célula-célula apropriada e as caderinas são as principais proteínas envolvidas no processo de adesão celular (TROSKO e RUCH 1998).

A maioria das células neoplásicas apresentam junções tipo fenda reduzidas com pouca expressão de conexina. A alteração da expressão de conexina foi encontrada em um grande número de tumores como da glia, hepatocarcinomas, endometriais e da cérvix (TROSKO e RUCH 1998; LANGLOIS et al. 2008). O aumento da expressão de conexina 43 também já foi descrito em células neoplásicas em diferentes estudos, porém não indica anormalidade da comunicação (TROSKO e RUCH 1998).

A expressão de conexina 43 foi observada no epitélio estratificado da cérvix humana. Em estudo imunistoquímico em cérvix humana, não houve marcação de conexina 43 nas células basais e estrato córneo e houve uma distribuição heterogênea da marcação para conexina 43 fosforilada na camada espinhosa e granulosa. Esta distribuição sugere uma diferença fisiológica entre as células localizadas nas diferentes camadas e especula-se que o padrão de fosforilação da conexina 43 se correlaciona com o estágio de diferenciação celular de um epitélio. Neste mesmo estudo observou-se que o aumento da expressão de conexina 43 fosforilada em NIC III (carcinoma *in situ*) e carcinoma invasivo da cérvix parece não ser a causa do processo de malignização, mas resultado da alteração da organização estrutural do tecido (LANGLOIS et al. 2008).

Alguns fatores de crescimento podem alterar a função das *gap junctions*. O mecanismo de inibição das *gap junctions* pelo fator de

crescimento epidérmico está relacionado ao estímulo de fosforilação das conexinas pela proteína quinase de ativação mitogênica (MAPK) e fechamento dos canais em fenda (TROSKO e RUCH 1998).

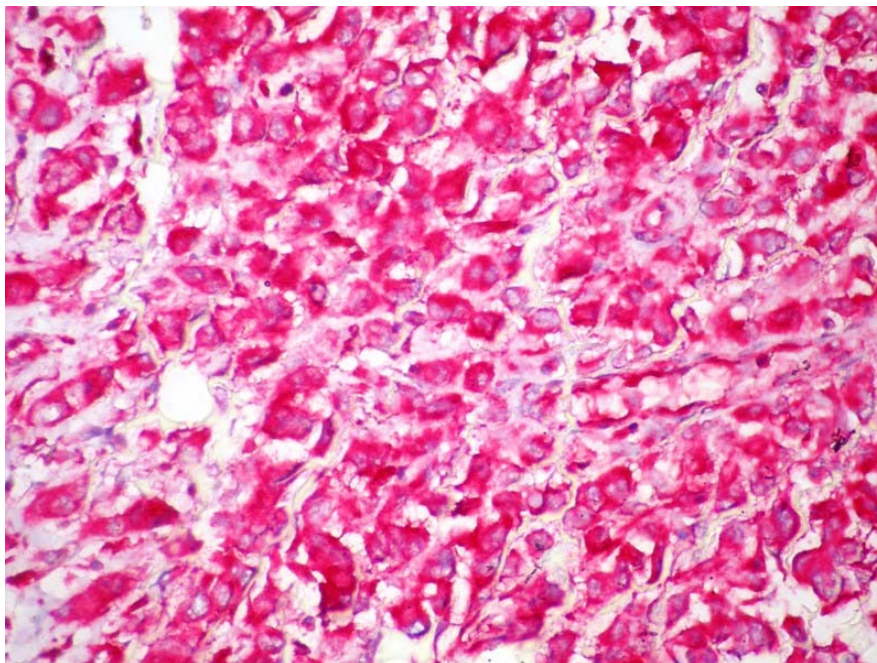
PATTON et al. (2005) estabeleceram um modelo de desenvolvimento do melanoma em *zebrafish* demonstrando a relevância patológica da ativação de BRAF e deficiência de p53 na formação do melanoma. Neste estudo a mutação de BRAF mostrou-se suficiente para a transformação de melanócitos em nevos. A mutação com ativação de BRAF por meio da via de ativação de MAPK associada à deficiência de p53 promoveu a transformação dos melanócitos em melanoma neste sistema animal.

No presente estudo houve maior expressão de conexina 43 nos melanomas cutâneos em relação aos nevos comuns e atípicos (Figuras 9 e 10). A maior expressão verificada em células do melanoma é compatível com o encontrado por LANGLOIS et al. (2008) em NIC III e carcinoma invasivo da cérvix. Porém, a conexina 43 neste estudo apresentou-se com maior expressão na membrana celular e a conexina 43 utilizada por LANGLOIS et al. (2008) apresentou-se com expressão aumentada no citoplasma.

A menor expressão dos nevos comuns e atípicos em relação ao melanoma encontrada em nosso estudo (Figuras 9 e 10) poderia ser explicada baseando-se nos achados de PATTON et al. (2005) em relação aos nevos e melanomas, ou seja, nos nevos e nas fases iniciais dos melanomas ocorreria mutação e ativação de BRAF levando à ativação da cascata de sinalização de MAPK e conseqüentemente inibindo as *gap*

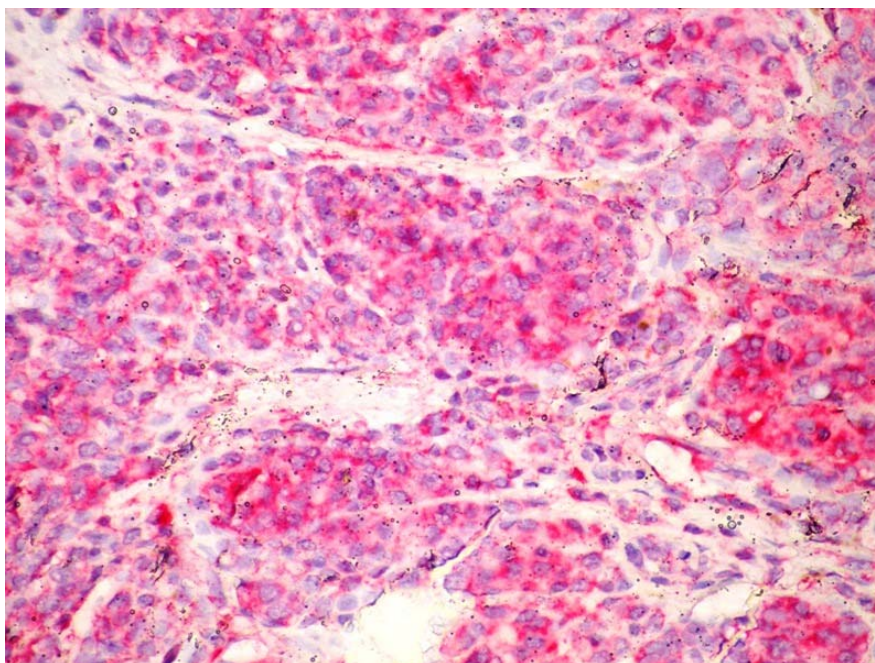
junctions por meio da fosforilação da conexina 43. Nas fases mais tardias do modelo de progressão tumoral dos melanomas cutâneos a conexina 43 tem aumento de sua expressão provavelmente relacionado à invasão e metástase. Infelizmente quando se avaliou a expressão de conexina 43 e espessura de Breslow os dados não se mostraram significativos e não foi possível confirmar a hipótese de que nos melanomas finos a expressão de conexina 43 é menor em relação aos melanomas intermediários e espessos. O mesmo ocorreu em relação à comparação entre a expressão de conexina 43 e o estadiamento do melanoma.

No estudo de associação entre a expressão de conexina 43 e o status linfonodal observou-se uma maior expressão desta proteína em pacientes com metástase linfonodal em relação aos que não a apresentaram. Este dado indiretamente corrobora nossa hipótese de que nas fases mais tardias do melanoma a conexina 43 se apresentaria com maior expressão.



Legenda: Maior expressão de Cx43 na membrana celular (coloração rósea).

Figura 9 - Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de Cx43 em células do melanoma.



Legenda: Menor expressão de Cx43 na membrana celular (coloração rósea).

Figura 10 - Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de Cx43 em células névicas.

CK5

A expressão de CK5 nos estudos de microarranjos de cDNA anteriormente realizados pelo grupo de REIS et al. (dados não publicados) foi evidenciada após microdissecção à laser das áreas de interesse, sem a contaminação de eventuais elementos epiteliais. Este detalhe técnico é muito importante, uma vez que não há apenas uma menção na literatura da presença de CK5 em melanócitos e que os resultados mostraram aumento da expressão dos genes de CK5 nos nevos em relação aos melanomas. De fato, em nossos resultados, a expressão imunohistoquímica de CK5 foi maior em nevos atípicos em relação ao melanoma, embora em nevos comuns se tenha encontrado expressão bem menor, em oposição ao trabalho com microarranjos onde a expressão era muito superior em nevos em relação aos melanomas.

O tecido mamário é composto por dois tipos celulares distintos, as células luminais e basais que apresentam diferentes padrões de expressão das citoceratinas. As células luminais contêm as CK7, CK8, CK18 e CK19 e as células basais contêm citoceratinas de alto peso molecular, as CK5 e CK14. O perfil das citoceratinas em certos processos patológicos da mama pode ajudar na identificação da natureza das células patológicas, permitindo a realização do diagnóstico. Na hiperplasia ductal da mama a maioria das células coram para os anticorpos CK5 e CK6. Em contraste, o carcinoma ductal convencional *in situ*, formado por células predominantemente ductais, cora para as CK8, CK18 e CK19 e não coram para CK5 e CK6. Essa diferença do perfil de expressão das citoceratinas por meio do estudo imunohistoquímico tem sido explorada com sucesso atualmente na distinção

entre hiperplasias ductais da mama e o carcinoma ductal *in situ* da mama (RABBAN et al. 2006). A expressão de CK5 e CK6 também se mostrou útil na distinção entre a hiperplasia ductal da mama e o carcinoma ductal sólido *in situ* da mama (subtipo de carcinoma muito semelhante histologicamente à hiperplasia ductal da mama) uma vez que as amostras de tecido do carcinoma ductal sólido *in situ* da mama não corou para as CK5 e CK6 (RABBAN et al. 2006).

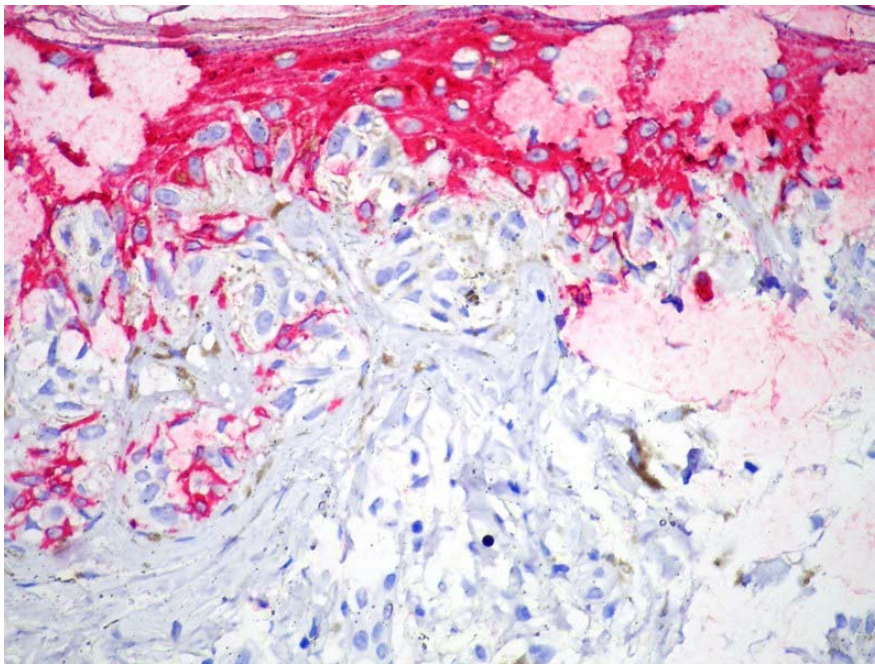
CHU e WEISS (2002) realizaram um estudo com 509 casos de carcinomas de diferentes órgãos e verificaram a expressão de CK5/6. Confirmaram a utilidade de CK5/6 na distinção entre mesotelioma (aumento de expressão) de adenocarcinoma pulmonar (ausência de expressão) e de adenocarcinoma não pulmonar (aumento de expressão, porém com necessidade de associação com outros marcadores tumorais para realização do diagnóstico). Observaram que os carcinomas originados do epitélio estratificado e de células mioepiteliais originadas de vários tecidos coraram para CK5/6, podendo ser usado como marcador de carcinoma espinocelular, carcinoma basocelular, carcinoma de células transicionais, tumores de glândulas salivares e timoma. A proteína CK5/6 também se mostrou útil na distinção entre glândulas prostáticas benignas e malignas (CHU e WEISS 2002).

No estudo de RABBAN et al. (2006) a CK5 teve papel na diferenciação entre lesões hiperplásicas ductais (consideradas pré-neoplasias) da mama e o carcinoma ductal *in situ*. As lesões hiperplásicas ductais expressaram CK5 e o carcinoma ductal *in situ* não expressou a

proteína. Embora a comparação de células epiteliais com melanócitos, células de origens embriológicas diferentes seja discutível, em nosso trabalho, a sua maior expressão nos nevos atípicos, poderia significar um possível marcador de transformação maligna, baseando-se nas observações de RABBAN et al. (2006).

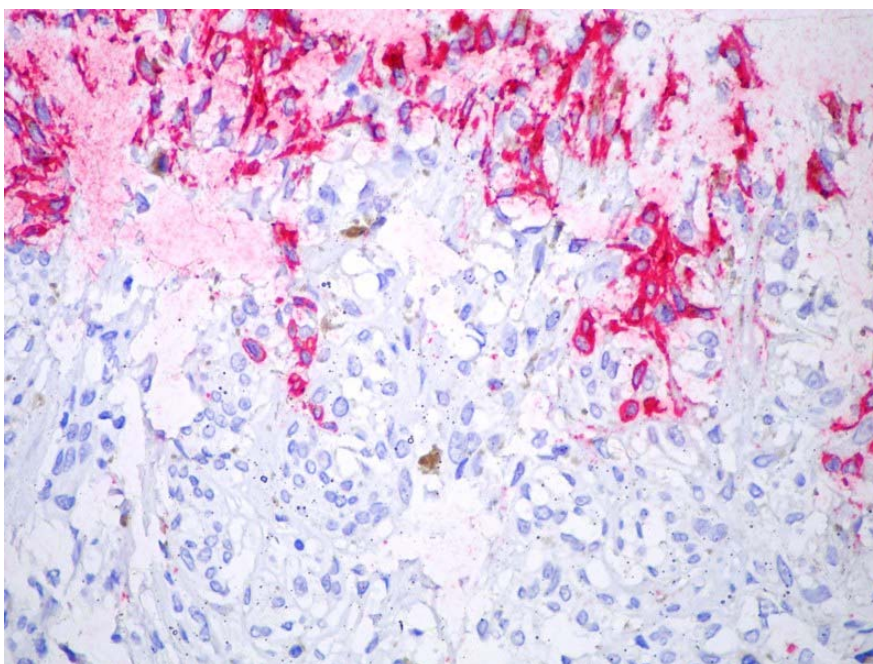
A menor expressão de CK5 observada nos nevos comuns em relação aos nevos atípicos e melanoma em nosso estudo (Figuras 11 a 13) poderia ser justificada pela perda da adesão célula-célula que ocorre com a troca da E-caderina por N-caderina na superfície celular e alterações na expressão de DSC3 levando à perda da adesão celular (GONTIER et al. 2004). A extremidade dos filamentos intermediários (compostos pelas ceratinas) está ancorada nos desmossomos e se associa aos componentes laterais desmoplaquina e plakoglobina, que por sua vez estão ligadas as desmocolinas (Figura 14) (ALBERTS et al. 1997). A menor expressão de desmocolina 3 poderia levar à menor expressão de CK5 nas células névicas devido a perda da adesão celular e conseqüentemente perda da capacidade das citoceratinas de formarem filamentos. Esta perda da formação dos filamentos foi descrita por KATAGATA et al. (1999) em cultura de células de melanoma, mas acreditamos que ela já se inicie nos nevos comuns (fase inicial do modelo de progressão do melanoma). Assim, justifica-se o encontro de menor expressão de citoceratina 5 em nevos em relação aos melanomas cutâneos. Postula-se que nos melanomas a perda da adesão celular seja maior, havendo maior desestruturação celular e maior expressão da citoceratina 5.

O encontro da expressão aumentada da citoceratina 5 nos nevos atípicos pode ser justificada pela contaminação dos ceratinócitos basais que expressam esta proteína, como descrito por BHAWAN et al. (2005). Sugerimos que a expressão de CK5 possa ser maior que a encontrada nos nevos comuns, porém acreditamos que não seja maior que a expressão encontrada nos melanomas cutâneos. Nos melanomas haveria importante perda da adesão celular e conseqüentemente perda da estrutura celular acentuada com maior expressão de CK5. Por ausência de dados da literatura que corroborem com nossas observações, não existe segurança em afirmar que os eventos descritos ocorram na comunicação entre os melanócitos.



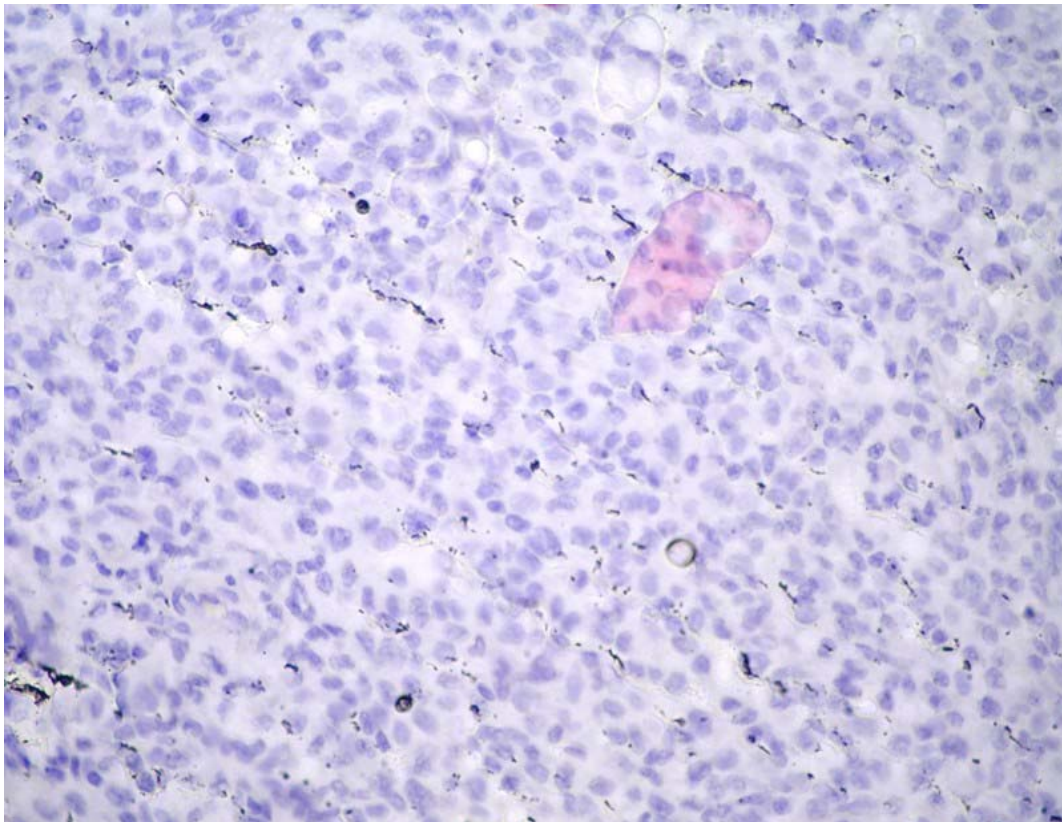
Legenda: Menor expressão de CK5 citoplasmática. Notar a ausência da pigmentação em ninhos de células névicas.

Figura 11 - Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de CK5 em células de nevo comum.



Legenda: Maior expressão de CK5 citoplasmática. Notar a dificuldade de demarcação das áreas contendo células atípicas na epiderme pela presença dos ceratinócitos pigmentados.

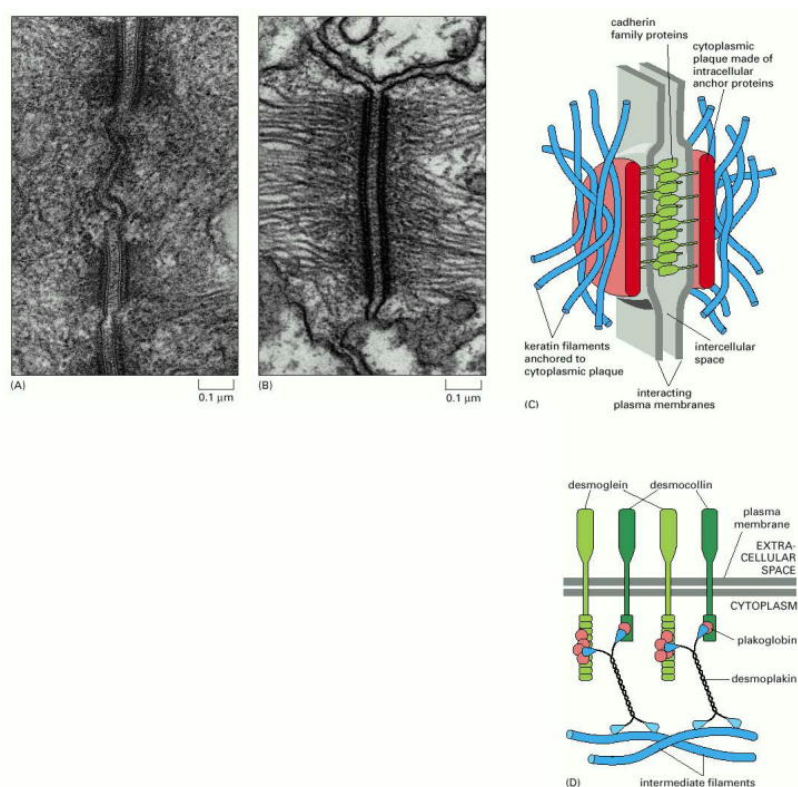
Figura 12 - Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de CK5 em células atípicas do nevo atípico.



Legenda: Expressão intermediária no citoplasma. Notar a sensibilidade da microscopia digital na detecção do marcador.

Figura 13 - Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de CK5 em células do melanoma cutâneo.

Diante destes resultados, é lícito supor que as estruturas denominadas hemidesmosomos, propostas por TARNOWSKI (1970) possam ter participação neste mecanismo de adesão.



Legenda: (A) Eletromicrografia de 3 desmosomos de células intestinais de camundongo. (B) Eletron micrografia de um único desmosomo entre duas células epidérmicas mostrando os filamentos intermediários. (C) Os componentes estruturais de um desmosomo. Na superfície citoplasmática de cada célula existe uma placa densa composta de proteínas de ancoragem intracelular. Os filamentos intermediários estão aderidos na superfície celular de cada placa. Proteínas de adesão transmembrana da família das caderinas se ligam à placa e interagem com o domínio extracelular da membrana celular adjacente por meio de um mecanismo cálcio dependente. (D) Alguns dos componentes moleculares do desmosomo. A desmogleína e a desmocolina são membros da família das proteínas de adesão caderinas. Suas caudas citoplasmáticas se ligam à plakoglobina que por sua vez se liga à desmoplaquina. A desmoplaquina também se liga aos filamentos intermediários.

Fonte: ALBERTS et al. (1997)

Figura 14 - A estrutura do desmosomo e sua correlação com CK5.

A diferença de expressão de CK5 em nevos comuns, nevos atípicos e melanomas observada em nosso estudo poderia compor um padrão de expressão que ajudaria na distinção das etapas do modelo de progressão do melanoma cutâneo. A lesão precursora (nevo comum) apresentaria menor expressão da proteína, a lesão intermediária (nevo atípico) apresentaria maior expressão e a lesão neoplásica invasiva (melanoma) apresentaria expressão intermediária.

- **KLKs**

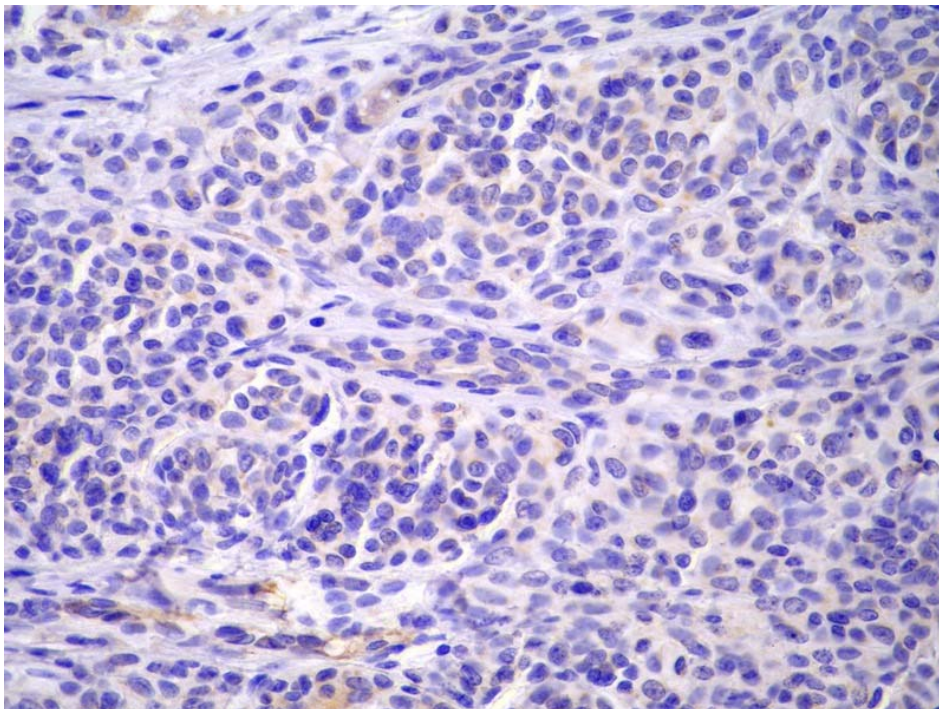
Por meio da técnica de PCR, JOHNSON et al. (2007) encontraram o aumento da expressão de KLK7 em adenocarcinomas ductais pancreáticos em relação ao tecido pancreático normal. Baseados nas observações de que a KLK7 está envolvida com a descamação celular e tem a propriedade de clivar o domínio extracelular da proteína E-caderina diminuindo a agregação entre as células pancreáticas, propuseram que a expressão aberrante de KLK7 pode ter papel importante no desenvolvimento do câncer pancreático.

Utilizando tecido fresco congelado, SHAN et al. (2006) observaram que a proteína KLK7 se apresentava em baixas concentrações em tecido ovariano normal, em lesões benignas do ovário e tumores não ovarianos metastáticos. No câncer ovariano, entretanto, KLK7 se encontrava 10 a 15 vezes aumentada e este aumento se correlacionou com os estádios mais avançados da doença.

Em relação à KLK6, além de se mostrar envolvida com a cascata proteolítica da descamação epidérmica, foi encontrada com grande

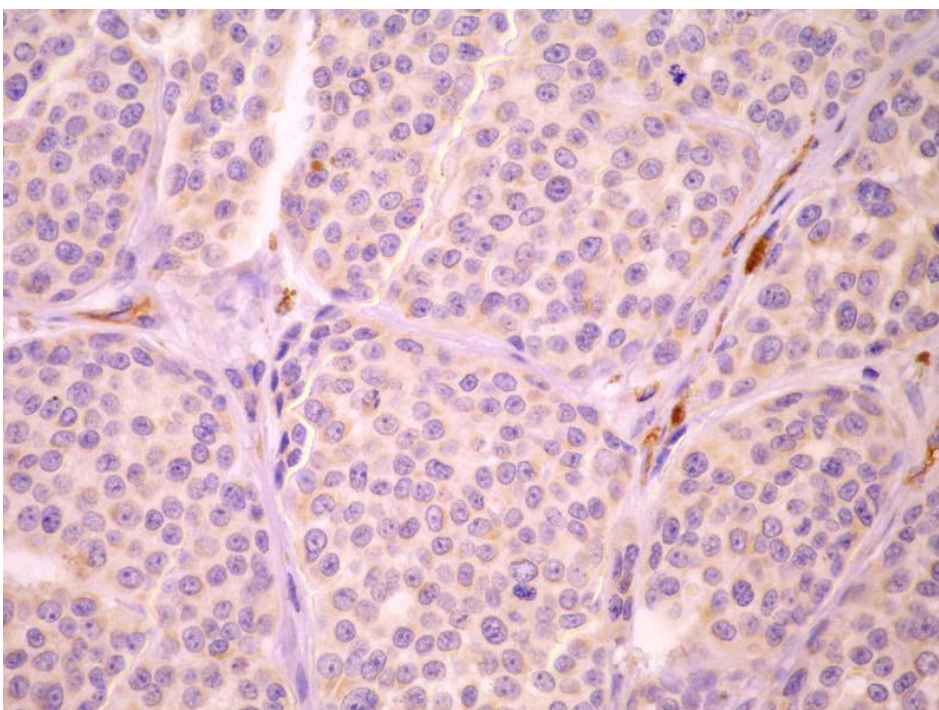
expressão em doenças do sistema nervoso central (SNC). Alguns achados laboratoriais sugeriram que a KLK6 é uma molécula mediadora inflamatória das doenças desmielinizantes do SNC (CHRISTOPHI et al. 2004).

Em nosso estudo encontramos maior expressão de calicreina 6 e calicreina 7 em melanomas cutâneos em relação aos nevos comuns. Este achado é semelhante ao encontrado por JOHNSON et al. (2007) em adenocarcinomas ductais pancreáticos em relação ao tecido pancreático normal. Baseando-se nestes achados, podemos também hipotetizar que as calicreinas seriam responsáveis pela perda da adesão celular por meio da clivagem das E-caderinas e que este processo se iniciaria nas lesões névicas e estaria muito aumentado nos melanomas. A maior expressão de calicreina 7 encontrada nos nevos atípicos em relação aos nevos comuns e melanoma é difícil de ser justificada devido à ausência de publicações na literatura médica (Figuras 15 a 19).



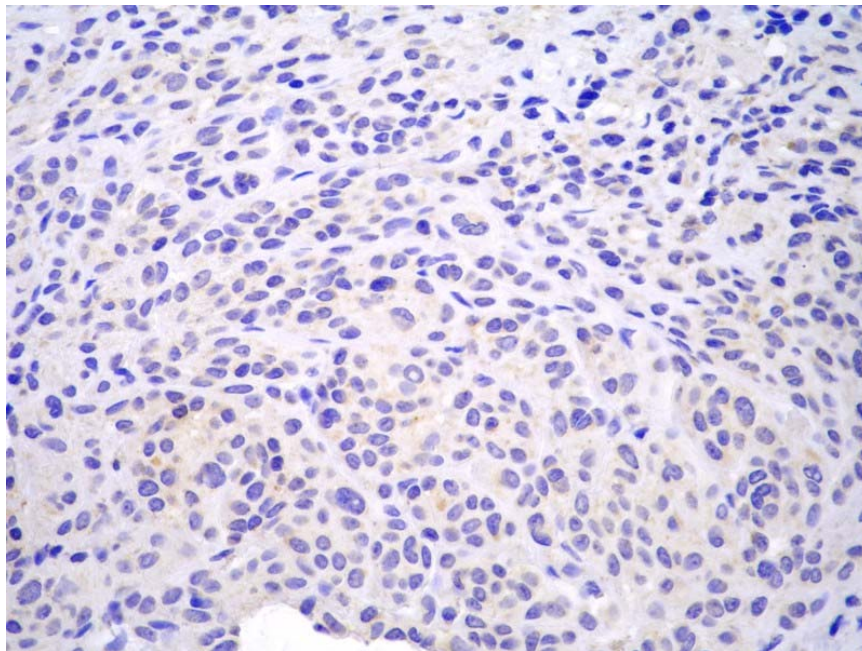
Legenda: Menor expressão de KLK6 citoplasmática (coloração acastanhada).

Figura 15 - Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de KLK6 em células névicas.



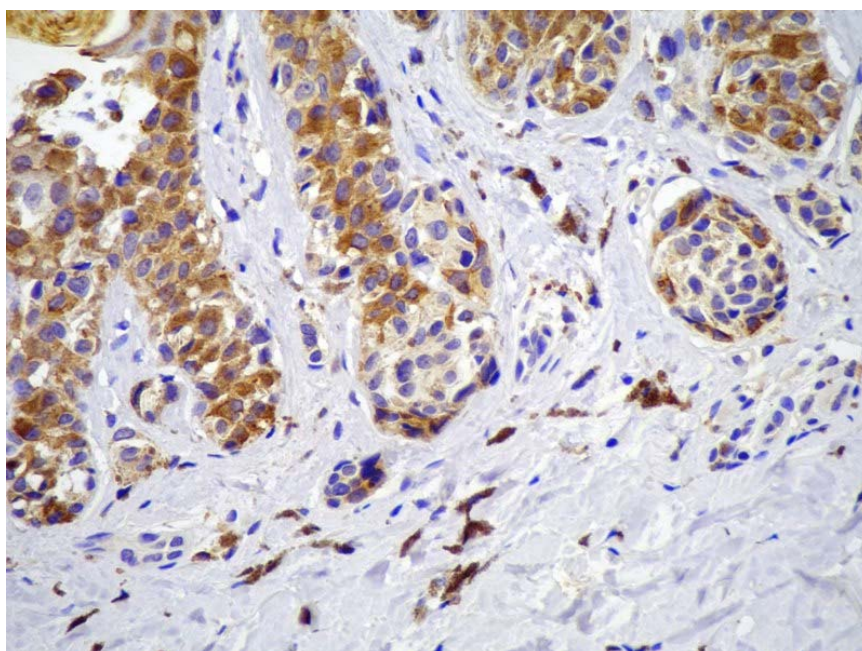
Legenda: Maior expressão de KLK6 no citoplasmática (coloração acastanhada).

Figura 16 - Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de KLK6 em células de melanoma.



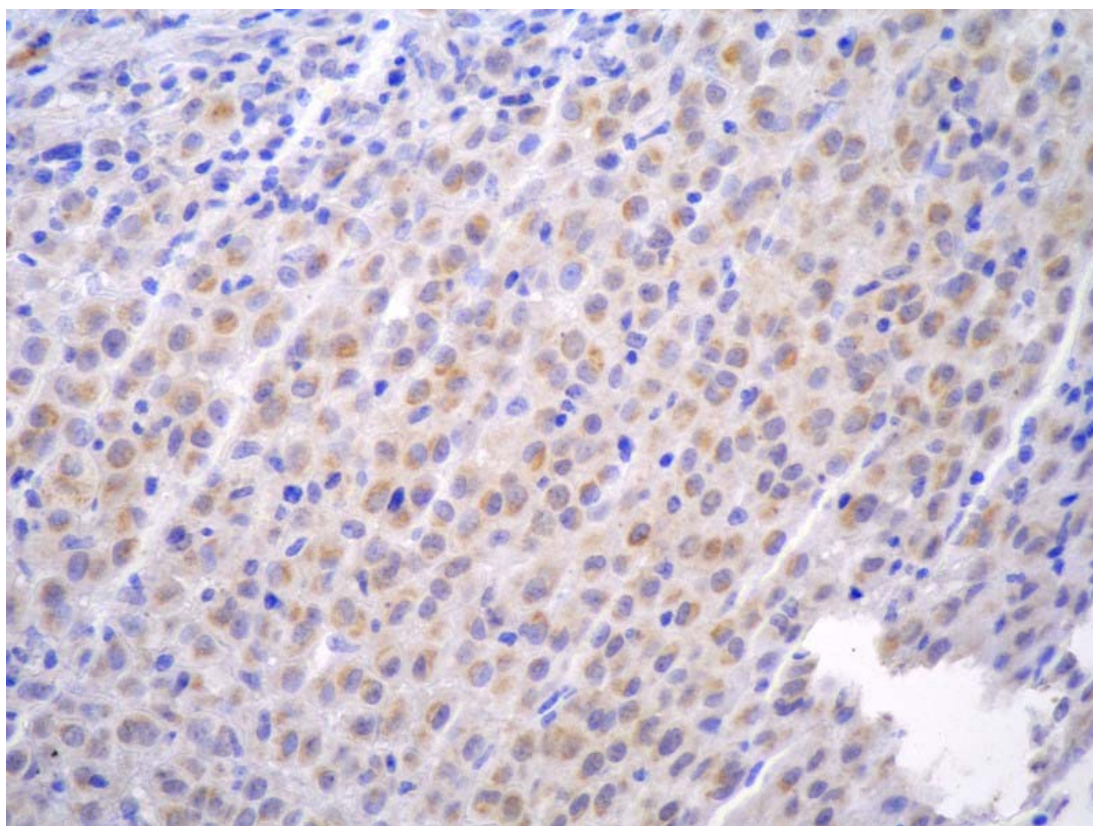
Legenda: Menor expressão de KLK7 citoplasmática (coloração acastanhada).

Figura 17 - Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de KLK7 em células névicas.



Legenda: Maior expressão de KLK7 citoplasmática (coloração acastanhada). Notar a dificuldade de demarcação das áreas contendo células atípicas na epiderme pela presença dos ceratinócitos pigmentados.

Figura 18 - Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de KLK7 em células atípicas do nevo atípico.



Legenda: Expressão intermediária de KLK7 citoplasmática (coloração acastanhada).

Figura 19 - Microfotografia (400X): Expressão imunoistoquímica de KLK7 em células do melanoma.

A associação da expressão da calicreina 7 com a espessura de Breslow mostrou que nos melanomas finos (<1,00mm) esta era maior em relação aos melanomas espessos (>4mm). Em relação ao estadiamento, a calicreina 7 mostrou-se maior no estágio 1 em relação ao estágio 2 nos melanomas. Na avaliação do status linfonodal a calicreina 7 apresentou maior expressão nos pacientes sem metástase linfonodal em relação aqueles com metástase linfonodal. Podemos então hipotetizar que a maior expressão de calicreina 7 é um evento precoce no desenvolvimento dos melanomas cutâneos.

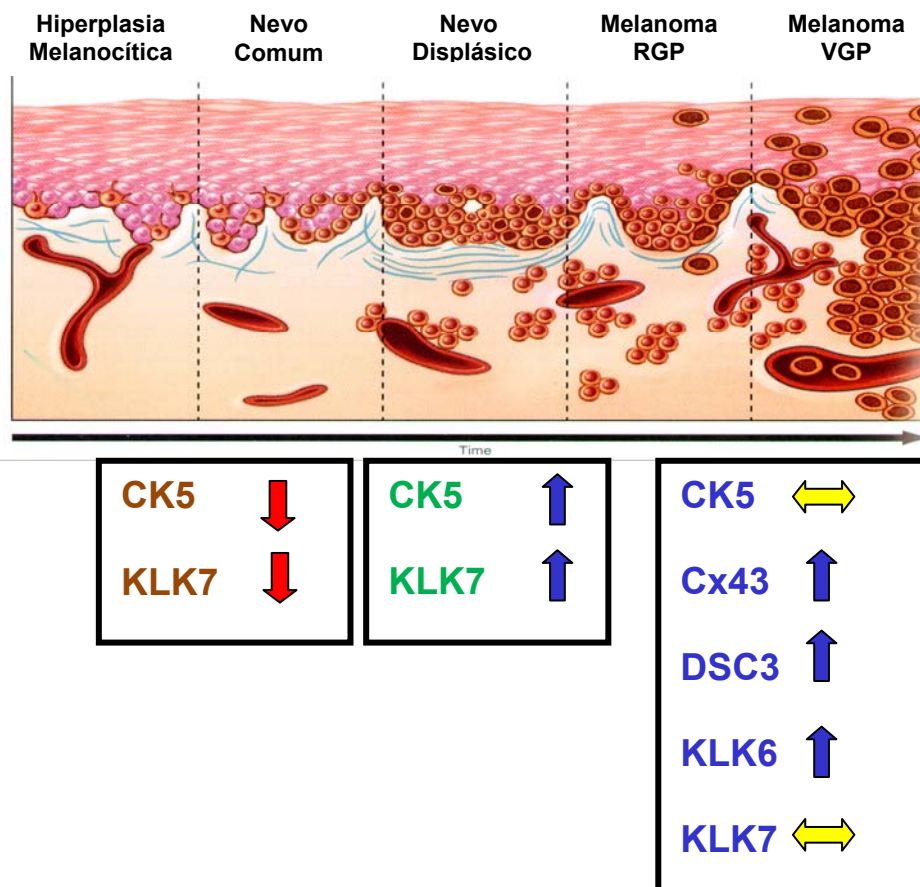
6.1 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS MARCADORES BIOMOLECULARES

A correlação entre as proteínas Cx43 e DSC3 foi positiva e moderada (considerado um bom coeficiente de Spierman – rho). Esta correlação pode ser justificada pelo envolvimento destas duas proteínas na adesão celular. Neste estudo de fato verificou-se uma maior expressão de conexina 43 e calicreina 7 nos melanomas em relação aos nevos comuns e atípicos.

A correlação entre as proteínas calicreina 6 e calicreina 7 foi positiva e moderada. Este dado corrobora o que foi observado por Borgono e colaboradores, que a calicreina 6 participa de uma cascata de ativação que culminaria com a ativação de calicreina 7, justificando o encontro destas proteínas aumentadas nos melanomas em relação aos nevos (BORGONÓ et al. 2007).

6 CONCLUSÃO

1. A microscopia digital permitiu a realização de análise quantitativa para comparação da expressão imunoistoquímica dos marcadores dentro do modelo de progressão do melanoma, como proposto inicialmente;
2. O método utilizado permitiu observar expressões diferenciais nos marcadores biomoleculares identificados pela técnica de microarranjos de cDNA, embora os resultados finais não sejam os mesmos;
3. A expressão de desmocolina 3, conexina 43, foi maior em melanomas, comparando-se com a de nevos comuns e nevos atípicos;
4. A expressão de citoceratina 5 e calicreina 7 foi maior em nevos atípicos em relação a melanomas e nevos comuns e maior nos melanomas em relação aos nevos comuns;
5. A expressão de calicreina 6 foi maior em melanomas, comparando-se com a de nevos comuns;
6. Houve uma correlação positiva e moderada entre a expressão de conexina 43 e desmocolina 3.
7. Houve uma correlação positiva e moderada entre a expressão de calicreina 6 e calicreina 7.



Legenda: Modelo de Progressão Tumoral em Melanomas evidenciando a expressão estatisticamente significativa das proteínas estudadas. Na fase inicial da progressão, nos nevos houve menor expressão de CK5 e KLK7. Na fase do nevo atípico observou-se maior expressão de CK5 e KLK7. Na fase do melanoma verificou-se maior expressão de Cx43, DSC3, KLK6 e KLK7. A seta vermelha indica menor expressão, a azul maior expressão e amarela, expressão intermediária.

Fonte: Adaptado de CLARK et al. (1984)

Figura 20 - Modelo de Progressão Tumoral em Melanomas e a expressão das proteínas estudadas,

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. **Biologia molecular da célula**. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997. Junções celulares, adesão celular e a matriz extracelular; p.949-1010.

Alizadeh AA, Ross DT, Perou CM, van de Rijn M. Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns. **J Pathol** 2001; 195:41-52.

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

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 S-J, 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** 2001a; 19:3622-34.

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, 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.

Biedermann K, Vogelsang H, Becker I, et al. Desmoglein 2 is expressed abnormally rather than mutated in familial and sporadic gastric cancer. **J Pathol** 2005; 207:199-206.

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

Boissy RE. Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. **Exp Dermatol** 2003; 12 Suppl 2:5-12.

Borgoño CA, Michael IP, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. **Mol Cancer Res** 2004; 2:257-80.

Borgoño CA, Michael IP, Komatsu N, et al. A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation. **J Biol Chem** 2007; 282:3640-52.

Bower CP, Lear JT, Bygrave S, Etherington D, Harvey I, Archer CB. Basal cell carcinoma and risk of subsequent malignancies: a cancer registry-based study in Southwest England. **J Am Acad Dermatol** 2000; 42:988-91.

Brattsand M, Stefansson K, Lundh C, Haasum Y, Egelrud T. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. **J Invest Dermatol** 2005; 124:198-203.

Bhawan J, Whren K, Panova I, Yaar M. Keratin 16 expression in epidermal melanocytes of normal human skin. **Am J Dermatopathol** 2005; 27:476-81.

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

Brochez L, Verhaeghe E, Grosshans E, et al. Inter-observer variation in the histopathological diagnosis of clinically suspicious pigmented skin lesions. **J Pathol** 2002; 196:459-66.

Bubendorf L. High-throughput microarray technologies: from genomics to clinics. **Eur Urol** 2001; 40:231-8.

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

Caubet C, Jonca N, Brattsand M, et al. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. **J Invest Dermatol** 2004; 122:1235-44.

Chammas R, Duarte APM, Otake AH, Costa M. Genética e biologia molecular do melanoma e de sua progressão. In: Oliveira Filho RS, editor. **Melanoma cutâneo localizado e linfonodo sentinela**. São Paulo: Lemar; 2003. p.1-19.

Chu DH, Haake AR, Holbrook K, Loomis CA. The structure and development of skin. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolf K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editors. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2003. p.58-88.

Chu PG, Weiss LM. Expression of cytokeratin 5/6 in epithelial neoplasms: an immunohistochemical study of 509 cases. **Mod Pathol** 2002; 15:6-10.

Christophi GP, Isackson PJ, Blaber S, Blaber M, Rodriguez M, Scarisbrick IA. Distinct promoters regulate tissue-specific and differential expression of kallikrein 6 in CNS demyelinating disease. **J Neurochem** 2004; 91:1439-49.

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.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. **J Natl Cancer Inst** 1989; 81:1893-904.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum Pathol** 1984; 15:1147-65.

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

Deraison C, Bonnart C, Lopez F, et al. LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. **Mol Biol Cell** 2007; 18:3607-19.

El-Deiry WS. Targeting mutant p53 shows promise for sunscreens and skin cancer. **J Clin Invest** 2007; 117:3658-60.

Egelrud T, Brattsand M, Kreutzmann P, et al. hK5 and hK7, two serine proteinases abundant in human skin, are inhibited by LEKTI domain 6. **Br J Dermatol** 2005; 153:1200-3.

Elder DE, Rodeck U, Thurin J, et al. Antigenic profile of tumor progression stages in human melanocytic nevi and melanomas. **Cancer Res** 1989; 49:5091-6.

Ferrone CR, Ben Porat L, Panageas KS, et al. Clinicopathological features of and risk factors for multiple primary melanomas. **JAMA** 2005; 294:1647-54.

Francken AB, Shaw HM, Thompson JF, et al. The prognostic importance of tumor mitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous melanoma and long follow-up. **Ann Surg Oncol** 2004; 11:426-33.

Frantz GD, Pham TQ, Peale FV Jr, Hillan KJ. Detection of novel gene expression in paraffin-embedded tissues by isotopic in situ hybridization in tissue microarrays. **J Pathol** 2001; 195:87-96.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. **Eur J Cancer** 2005c; 41:45-60.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. **Eur J Cancer** 2005b; 41:2040-59.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. **Eur J Cancer** 2005c; 41:28-44.

Gontier E, Cario-André M, Vergnes P, Lepreux S, Surlève-Bazeille JE, Taïeb A. The role of E-cadherin in nevogenesis: an experimental study using epidermal reconstructs. **Exp Dermatol** 2004; 13:326-31.

Goldstein AM, Tucker MA. Genetic epidemiology of familial melanoma. **Dermatol Clin** 1995; 13:605-12.

Grulich AE, Bataille V, Swerdlow AJ, et al. Naevi and pigmentary characteristics as risk factors for melanoma in a high-risk population: a case-control study in New South Wales, Australia. **Int J Cancer** 1996; 67:485-91.

Grulich AE, Wan X, Law MG, Coates M, Kaldor JM. Risk of cancer in people with AIDS. **AIDS** 1999; 13:839-43.

Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D, et al. The gene expression signatures of melanoma progression. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102:6092-7.

Halaban R. Molecular correlates in the progression of normal melanocytes to melanomas. **Semin Cancer Biol** 1993; 4:171-81.

Hanaban R, Herbert DN, Fisher DE. Biology of melanocytes. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolf K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editors. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2003. p.127-48.

Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K. Different effects of dominant negative mutants of desmocollin and desmoglein on the cell-cell adhesion of keratinocytes. **J Cell Sci** 2000; 113:1803-11.

Hes O, Michal M, Kuroda N, et al. Vimentin reactivity in renal oncocytoma: immunohistochemical study of 234 cases. **Arch Pathol Lab Med** 2007; 131:1782-8.

Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, et al. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. **Am J Pathol** 2000; 156:1515-25.

Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. p53-related pathways and the molecular pathogenesis of melanoma. **Eur J Cancer Prev** 2003; 12:93-100.

Isaacson C, Ramsay M. Does the sun play a role in the aetiology of malignant melanoma? **S Afr Med J** 2007; 97:568-71.

Jensen P, Hansen S, Møller B, et al. Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. **J Am Acad Dermatol** 1999; 40:177-86.

Johnson SK, Ramani VC, Hennings L, Haun RS. Kallikrein 7 enhances pancreatic cancer cell invasion by shedding E-cadherin. **Cancer** 2007; 109:1811-20.

Kanehira K, Hu J, Pier T, Sebree L, Huang W. High endogenous avidin binding activity: an inexpensive and readily available marker for the differential diagnosis of kidney neoplasms. **Int J Clin Exp Pathol** 2008; 1:435-9.

Katagata Y, Aoki T, Kawa Y, Mizoguchi M, Kondo S. Keratin subunit expression in human cultured melanocytes and mouse neural crest cells without formation of filamentous structures. **J Invest Dermatol Symp Proc** 1999; 4:110-5.

Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, et al. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. **J Invest Dermatol** 2003; 120:1087-93.

Khan K, Hardy R, Haq A, Ogunbiyi O, Morton D, Chidgey M. Desmocollin switching in colorectal cancer. **Br J Cancer** 2006; 95:1367-70.

Kielhorn E, Provost E, Olsen D, et al. Tissue microarray-based analysis shows phospho-beta-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.

Kittler H. The life of melanocytic nevi. In: Soyer HP, Argenziano G, Holfmann-Wellenhof R, Johr RH, editors. **Color atlas of melanocytic lesions of the skin**. New York: Springer Verlag; 2007. p.61-5.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput 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.

Kraemer KH. NRAS hypermutability in familial melanoma with CDKN2A mutations-cause and effect? **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:768-9.

Langley RG, Barnhill RL, Mihm MC, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Neoplasms: cutaneous melanoma. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, editors. **Dermatology in general medicine**. New York: McGraw-Hill; 1999. p.1080-116.

Langlois S, Cowan KN, Shao Q, Cowan BJ, Laird DW. Caveolin-1 and -2 interact with connexin43 and regulate gap junctional intercellular communication in keratinocytes. **Mol Biol Cell** 2008; 19:912-28.

Larue L, Kumasaka M, Goding CR. Beta-catenin in the melanocyte lineage. **Pigment Cell Res** 2003; 16:312-7.

Levi F, La Vecchia C, Randimbison L, Te VC, Erler G. Incidence of invasive cancers following cutaneous malignant melanoma. **Int J Cancer** 1997; 72:776-9.

Lewis F, Maughan NJ, Smith V, Hillan K, Quirke P. Unlocking the archive--gene expression in paraffin-embedded tissue. **J Pathol** 2001; 195:66-71.

Li G, Herlyn M. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. **Mol Med Today** 2000; 6:163-9.

Li X, Regezi J, Ross FP, et al. Integrin α v β 3 mediates K1735 murine melanoma cell motility in vivo and in vitro. **J Cell Sci** 2001; 114:2665-72.

Lima Junior CLH. **Modulação expressão de Ciclina D1, CDK4, p16ink4, p21WAF1, integrina α V β 3, MMP-2 e MMP-9 em melanoma cutâneo primário de pacientes submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela.** São Paulo; 2006. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Livingston PM, White V, Hayman J, Dobbinson S. Australian adolescents' sun protection behavior: who are we kidding? **Prev Med** 2007; 44:508-12.

Lorentzen H, Weismann K, Petersen CS, Larsen FG, Secher L, Skodt V. Clinical and dermatoscopic diagnosis of malignant melanoma. Assessed by expert and non-expert groups. **Acta Derm Venereol** 1999; 79:301-4.

Maitra A, Gazdar AF, Moore TO, Moore AY. Loss of heterozygosity analysis of cutaneous melanoma and benign melanocytic nevi: laser capture microdissection demonstrates clonal genetic changes in acquired nevocellular nevi. **Hum Pathol** 2002; 33:191-7.

Marehbian J, Colt JS, Baris D, et al. Occupation and keratinocyte cancer risk: a population-based case-control study. **Cancer Causes Control** 2007; 18:895-908.

Marks R. The changing incidence and mortality of melanoma in Australia. **Recent Results Cancer Res** 2002; 160:113-21.

Marrett LD, King WD, Walter SD, From L. Use of host factors to identify people at high risk for cutaneous malignant melanoma . **CMAJ** 1992; 147:445-53.

Martins WK. **Análise do perfil de expressão gênica em melanomas humanos**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente].

Miettinen M, Franssila K. Immunohistochemical spectrum of malignant melanoma. The common presence of keratins. **Lab Invest** 1989; 61:623-8.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas/2005: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2004.

Muto NH. **Análise do perfil de expressão gênica de lesões melanocíticas**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Naeyaert JM, Brochez L. Clinical practice: dysplastic nevi. **N Engl J Med** 2003; 349:2233-40.

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.

Landman G; Muller H; Fillus Neto J; Maceira JMP; Marques M; Costa MB; Enokihara M; Sotto MN; Valente NY; Michalany NS. Consenso para o laudo anatomopatológico do melanoma cutâneo. Grupo Multicêntrico e Multidisciplinar Brasileiro para Estudo do Melanoma (GBM)/ Pathology report consensus for cutaneous melanoma. Brazilian Multicentric and Multidisciplinary Group for the Study of Melanoma (GBM). *Acta oncol. Bras*;23(3): 504-510, out.-dez. 2003.

Oshiro MM, Watts GS, Wozniak RJ, et al. Mutant p53 and aberrant cytosine methylation cooperate to silence gene expression. **Oncogene** 2003; 22:3624-34.

Oshiro MM, Kim CJ, Wozniak RJ, et al. Epigenetic silencing of DSC3 is a common event in human breast cancer. **Breast Cancer Res** 2005; 7:R669-80.

Pacifico MD, Grover R, Richman PI, Daley FM, Buffa F, Wilson GD. Development of a tissue array for primary melanoma with long-term follow-up: discovering melanoma cell adhesion molecule as an important prognostic marker. **Plast Reconstr Surg** 2005; 115:367-75.

Paliouras M, Borgono C, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family. **Cancer Lett** 2007; 249:61-79.

Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. **Curr Biol** 2005; 15:249-54.

Pham K, Milovanovic T, Barr RJ, Truong T, Holcombe RF. Wnt ligand expression in malignant melanoma: pilot study indicating correlation with histopathological features. **Mol Pathol** 2003; 56:280-5.

Piepkorn M. Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A (p16)/ARF tumor suppressors. **J Am Acad Dermatol** 2000; 42:705-22; quiz 723-6.

Platz A, Ringborg U, Hansson J. Hereditary cutaneous melanoma. **Semin Cancer Biol** 2000; 10:319-26.

Rabban JT, Koerner FC, Lerwill MF. Solid papillary ductal carcinoma in situ versus usual ductal hyperplasia in the breast: a potentially difficult distinction resolved by cytokeratin 5/6. **Hum Pathol** 2006; 37:787-93.

Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Brandão DF, Chahud F, Zucoloto S. p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. **Histopathology** 2005; 47:458-66.

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.

Rünger TM, Kappes UP. Mechanisms of mutation with long-wave ultraviolet light (UVA). **Photodermatol, Photoimmunol Photomed** 2008; 24:2-10.

Sá BCS. **Criação de "tissue array" de melanomas cutâneos extensivos superficiais para estudo imunistoquímico de fatores ligados à proliferação e apoptose celular.** São Paulo, 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Seykora JT, Jih D, Elenitsas R, Horng WH, Elder DE. Gene expression profiling of melanocytic lesions. **Am J Dermatopathol** 2003; 25:6-11.

Shan SJ, Scorilas A, Katsaros D, Rigault de la Longrais I, Massobrio M, Diamandis EP. Unfavorable prognostic value of human kallikrein 7 quantified by ELISA in ovarian cancer cytosols. **Clin Chem** 2006; 52:1879-86.

Shaw JL, Diamandis EP. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. **Clin Chem** 2007; 53:1423-32.

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.

Sigel JE, Skacel M, Bergfeld WF, House NS, Rabkin MS, Goldblum JR. The utility of cytokeratin 5/6 in the recognition of cutaneous spindle cell squamous cell carcinoma. **J Cutan Pathol** 2001; 28:520-4.

Simionato Neto D, Pantaleão L, Sá BC, Landman G. Alpha-v-beta3 integrin expression in melanocytic nevi and cutaneous melanoma. **J Cutan Pathol** 2007; 34:851-6.

Skender-Kalnenas TM, English DR, Heenan PJ. Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma? **J Am Acad Dermatol** 1995; 33:1000-7.

Slominski A, Wortsman J, Nickoloff B, McClatchey K, Mihm MC, Ross JS. Molecular pathology of malignant melanoma. **Am J Clin Pathol** 1998a; 110:788-94.

Slominski A, Paus R, Mihm MC. Inhibition of melanogenesis as an adjuvant strategy in the treatment of melanotic melanomas: selective review and hypothesis. **Anticancer Res** 1998b; 18:3709-15.

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

Tarnowski WM. Ultrastructure of the epidermal melanocyte dense plate. **J Invest Dermatol** 1970; 55:265-8.

Tellez CS, Davis DW, Prieto VG, et al. Quantitative analysis of melanocytic tissue array reveals inverse correlation between activator protein-2alpha and protease-activated receptor-1 expression during melanoma progression. **J Invest Dermatol** 2007; 127:387-93.

Thomas NE, Edmiston SN, Alexander A, et al. Number of nevi and early-life ambient UV exposure are associated with BRAF-mutant melanoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2007; 16:991-7.

Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. **Lancet** 2005; 365:687-701.

Trau H, Kopf AW, Rigel DS, et al. Regression in malignant melanoma. **J Am Acad Dermatol** 1983; 8:363-8.

Trosko JE, Ruch RJ. Cell-cell communication in carcinogenesis. **Front Biosci** 1998; 3:d208-36.

Tselepis C, Chidgey M, North A, Garrod D. Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:8064-9.

Tsao H. Genetics of nonmelanoma skin cancer. **Arch Dermatol** 2001; 137:1486-92.

Tucker MA, Boice JD Jr, Hoffman DA. Second cancer following cutaneous melanoma and cancers of the brain, thyroid, connective tissue, bone, and eye in Connecticut. **Natl Cancer Inst Monogr** 1985; 68:161-89.

Uliasz A, Lebwohl M. Patient education and regular surveillance results in earlier diagnosis of second primary melanoma. **Int J Dermatol** 2007; 46:575-7.

Wang L, Inohara H, Pienta KJ, Raz A. Galectin-3 is a nuclear matrix protein which binds RNA. **Biochem Biophys Res Commun** 1995; 217:292-303.

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

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.

Widlund HR, Fisher DE. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. **Oncogene** 2003; 22:3035-41.

Worret WI, Burgdorf WH. Which direction do nevus cells move? Abtropfung reexamined. **Am J Dermatopathol** 1998; 20:135-9.