

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
CENTRO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA**

**LEANDRO CARVALHO RIBEIRO**

**AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DOS MARCADORES Ki-67,  
Bcl-2 E p53 NO MELANOMA CUTÂNEO.**

**CURITIBA**

**2011**



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

**MESTRADO 2008/2010**



**AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DOS MARCADORES Ki-67, Bcl-2 E p53,  
NO MELANOMA CUTÂNEO.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

**ALUNO: Leandro Carvalho Ribeiro**

**ORIENTADOR: Dr. Flávio Daniel Saavedra Tomasich**

**CO-ORIENTADOR: Dr. Sérgio Ossamu Ioshii**

R484a     Ribeiro, Leandro Carvalho  
Avaliação prognóstica dos marcadores Ki-67, Bcl-2 e p53  
no melanoma cutâneo / Leandro Carvalho Ribeiro;  
orientador, Flávio Daniel Saavedra Tomasich. – Curitiba, 2011.  
xiii ; 62f.: il.; 29 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do  
Paraná, Curitiba, 2011  
Inclui bibliografias

1. Neoplasias Cutâneas. 2 Melanoma. 3. Marcadores de  
tumores. I. Tomasich, Flávio Daniel Saavedra. II. Pontifícia  
Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação  
em Clínica Cirúrgica..

CDD 616.94477



**ATA DA SESSÃO DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA AO NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

**ATA DE DISSERTAÇÃO Nº 78**

Aos vinte dias do mês de julho de 2011, realizou-se a sessão de defesa de dissertação "AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DOS MARCADORES Ki67, BCL-2 E P53, NO MELANOMA CUTÂNEO" Área de Concentração: Lesão Celular, Reparação e Cicatrização, apresentada por Leandro Carvalho Ribeiro sob orientação do Prof. Dr. Flávio Daniel Saavedra Tomasich.

Requisito para obtenção do título de mestre.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes professores:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Sergio Luiz Rocha	
Prof. Dr. Sergio Ossamu Ioshii	
Prof. Dr. Eduardo José R. Ramos	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Sergio Luiz Rocha Avaliação: APROVADO  
Prof. Dr. Sergio Ossamu Ioshii Avaliação: APROVADO  
Prof. Dr. Eduardo José R. Ramos Avaliação: APROVADO  
Parecer Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

Truço de 30 dias para apresentar o curso final com os conceitos seguintes:

Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

Em ciência, o que vale não são só opiniões. Há que haver embasamento e sustentação por dados concretos. Tudo que for mensurável deve ser realizado para o bem da ciência. Para que se faça ciência são necessárias medidas cuja validação seja indubitável. Afirmativas não sustentadas viram opinião.

*René Descartes*

1596-1650

Á meus pais que sempre incentivaram-me a estudar e melhorar minha formação e principalmente deram toda a estrutura sendo o alicerce para minha formação pessoal e profissional.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Dr. Flávio Daniel Saavedra Tomasich, amigo e orientador, meu reconhecimento pela inestimável contribuição e interesse em minha formação acadêmica.

Ao Professor Dr. Sérgio Ossamu Ioshii, co-orientador meu reconhecimento e gratidão pela ajuda e conselhos no desenvolvimento deste estudo.

À Dr.<sup>a</sup> Danielle Sakamoto, profissional e amiga minha gratidão pelo apoio na realização deste estudo no Laboratório.

Ao Professor Dr. Luiz Carlos Von Bahten coordenador do programa de pós-graduação em clínica cirúrgica da PUC-PR, pela oportunidade de aprendizado e evolução em minha carreira.

Ao Dr. Marcos Flávio Montenegro, por ter me acolhido em meu início de carreira e pelo incentivo em minha formação profissional.

Ao amigo Dr. Vinícius Preti por ter acreditado e dado início a este trabalho.

A Dr.<sup>a</sup> Rosyane Rena de Freitas por ter dado continuidade e apoio a este trabalho

Ao amigo Dr. Andrea Petruzzello pelo apoio, dedicação e companheirismo para a conclusão desta dissertação

Ao amigo Dr. Luís Cesar Bredt pelo apoio e esforço na conclusão deste trabalho

Aos acadêmicos do Hospital Erasto Gaertner pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram da elaboração deste trabalho contribuindo para sua conclusão.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas .....	ix
Lista de Gráficos e Figuras .....	x
Lista de Siglas .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 OBJETIVO.....	2
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
2.1 INCIDÊNCIA.....	3
2.2 FATORES DE RISCO.....	4
2.3 PROGRESSÃO EM MELANOMA.....	5
2.3.1 Crescimento Radial.....	5
2.3.2 Crescimento Vertical.....	6
2.4 FATORES PROGNÓSTICOS.....	6
2.4.1 Marcadores Moleculares.....	8
2.4.1.1 ki-67.....	11
2.4.1.2 Bcl-2.....	13
2.4.1.3 P53.....	14
2.5 MELANOMA E MICROARRANJOS TECIDUAIS.....	15
<b>3. MÉTODO</b> .....	17
3.1 GRUPO DE ESTUDO.....	17
3.1.1 Critérios de Inclusão.....	17
3.1.2 Critérios de Exclusão.....	17
3.2 MATERIAL HISTOLÓGICO.....	17
3.2.1 Obtenção e Armazenamento do Material.....	17
3.2.2 Técnica de Imunohistoquímica.....	18
3.2.3 Análise Histológica.....	19

3.2.3.1 Hematoxilina-eosina.....	19
3.2.3.2 Imunohistoquímica.....	19
3.3 ANÁLISE DA SOBREVIDA E SUBGRUPOS PROGNÓSTICOS.....	21
3.3.1 Análise Estatística.....	22
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
4.1 GRUPO DE ESTUDO E CARACTERÍSTICAS TUMORAIS.....	23
4.2 MARCADORES MOLECULARES, SOBREVIDA GLOBAL E SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA.....	24
4.2.1 p53.....	24
4.2.2 Ki-67.....	25
4.2.3 Bcl-2.....	26
4.3 SUBGRUPOS PROGNÓSTICOS.....	27
4.3.1 Espessura de Breslow.....	27
4.3.2 Índice Mitótico.....	28
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>42</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>46</b>

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Espessura do tumor segundo a AJCC de acordo com a amostra.....	23
Tabela 2 - Sobrevida global de acordo com a espessura tumoral de Breslow e expressão dos marcadores moleculares.....	27
Tabela 3 - Sobrevida livre de doença de acordo com a espessura tumoral de Breslow e expressão dos marcadores moleculares.....	28
Tabela 4 - Sobrevida global de acordo com o índice mitótico e expressão dos marcadores moleculares.....	29
Tabela 5 - Sobrevida livre de doença de acordo com o índice mitótico e expressão dos marcadores moleculares.....	29

## Lista de Gráficos e Figuras

Figura I – Fotomicrografia em aumento de 400 vezes mostrando reação positiva com reagente anti-Human ki-67 em tecido corado com hematoxilina e eosina contendo melanoma cutâneo.....	20
Figura II - Fotomicrografia em aumento de 400 vezes mostrando reação negativa com reagente anti-Human Ki-67 Antigen em tecido corado com hematoxilina e eosina contendo melanoma cutâneo.....	20
Figura III – Fotomicrografia em aumento de 400 x mostrando mitoses em tecido corado com hematoxilina e eosina contendo melanoma cutâneo.....	21
Gráfico 1 - Sobrevida global de acordo com a expressão do p53.....	24
Gráfico 2 - Sobrevida livre de doença de acordo com a expressão do p53 .....	25
Gráfico 3 - Sobrevida global de acordo com a expressão do Ki67.....	25
Gráfico 4 - Sobrevida livre de doença de acordo com a expressão do Ki67.....	26
Gráfico 5 - Sobrevida Global de acordo com a expressão do Bcl-2 .....	26
Gráfico 6 - Sobrevida livre de doença de acordo com a expressão do Bcl-2.....	27

## Lista de Siglas

ACS - American Cancer Society

AJCC - AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER

CGA - Campos de Grande Aumento

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EUA - Estados Unidos da América

GBM – Grupo Brasileiro de Melanoma

HE - Hematoxilina-Eosina

HEG – Hospital Erasto Gaertner

IHQ - Imunohistoquímica

INCA - Instituto Nacional do Câncer

NCCN - National Comprehensive Cancer Network

NCI - National Cancer Institute

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PTEN - Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10

PUC-PR - Pontifícia Universidade Católica do Paraná

SAME – Serviço de Arquivo Médico e Estatística

SPM – Serviço de Pele e Melanoma

Thr - Treonina

Tyr - Tirosina

UV - Ultravioleta

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor

## RESUMO

**Introdução:** o melanoma cutâneo é uma das neoplasias mais agressivas e sua incidência é crescente, com sobrevida média mundial de 69%. Não há cura efetiva nos pacientes com melanoma disseminado, por este motivo é importante estimar o risco de progressão. **Objetivo:** avaliar a correlação da expressão dos marcadores moleculares p53, Bcl-2 e Ki-67 com a sobrevida global e sobrevida livre de doença em pacientes portadores de melanoma cutâneo estratificando de acordo com a espessura de tumoral de Breslow e índice mitótico. **Método:** no período de 2000-2006 foram estudados 41 pacientes com melanoma cutâneo invasivo. As lâminas histológicas para a realização das provas imunohistoquímicas foram preparadas com a utilização da técnica de microarranjos teciduais. Os marcadores foram testados e correlacionados com a sobrevida global e sobrevida livre de doença isoladamente e de acordo com o Breslow e o índice mitótico. A análise estatística foi realizada com teste de Log-Rank, curvas de sobrevida Kaplan-Meier e teste de médias sendo considerados significantes os resultados com  $p < 0,05$ . **Resultado:** na análise individual, os marcadores não se mostraram significantes em relação à sobrevida global e sobrevida livre de doença nos pacientes com índice mitótico  $< 6$  mitoses/campo de maior aumento, a negatividade da expressão do Ki-67 mostrou-se significativa para o aumento da sobrevida global e intervalo livre de doença. Nos pacientes com Breslow  $< 1$  mm a negatividade do Ki-67 mostrou-se significativa para o maior intervalo livre de doença e nos pacientes com Breslow  $> 1$  mm mostrou-se significativo com a expressão do Ki-67 em relação à menor sobrevida global. **Conclusão:** as expressões dos marcadores moleculares para melanoma cutâneo avaliados neste estudo (p53, Bcl-2 e Ki-67) não apresentaram correlação estatisticamente significativa com a sobrevida global e sobrevida livre de doença no total de pacientes da presente amostra. A expressão do marcador Ki-67 apresentou uma correlação significativa com as taxas de sobrevida quando a população do estudo foi estratificada de acordo com a espessura tumoral de Breslow e índice mitótico.

Descritores: melanoma, Ki-67, p53, Bcl-2, sobrevida global, sobrevida livre de doença.

## ABSTRACT

**Introduction:** cutaneous melanoma is one of the most aggressive cancers and its incidence has been increasing worldwide. The mean overall survival of patients with melanoma is 69% in 5-year. There is no effective cure for patients with disseminated melanoma and for that reason it is important to estimate the risk of disease progression. **Objective:** to analyze the association of the expression of tumor markers Ki67, p53 and bcl2 with overall survival and disease free survival in patients with invasive melanoma, and stratified according to Breslow tumor thickness and mitotic index. **Methods:** between 2000 and 2006 41 patients with invasive cutaneous melanoma were studied. A tissue microarray built from melanoma tissue was assayed using immunohistochemistry for expression of Ki 67, p53 and bcl2. The expression status of each marker was correlated with overall survival and disease-free survival alone and according to Breslow thickness and mitotic index. Statistical analysis was performed using log-rank test for correlations and Kaplan-Meier for survival curves. Significant associations were considered if  $p < 0,05$ . **Results:** the expression status of each tumor marker evaluated did not correlate significantly with overall survival or disease-free survival. When a mitotic index of less than 6 mitoses / HPF was present in the absence of Ki-67 expression, there was a positive association with overall survival and disease-free survival. Patients with Breslow  $< 1$  mm and absence of Ki-67 expression demonstrated increase in disease-free survival. Furthermore, patients with Breslow  $> 1$  mm and Ki-67 expression presented improved overall survival. **Conclusion:** The expressions of molecular markers for melanoma in this study (p53, Bcl-2 and Ki-67) showed no statistically significant correlation with overall survival and disease-free survival. The expression of Ki-67 marker showed a significant correlation with survival rates when the study population was stratified according to Breslow tumor thickness and mitotic index.

**Keywords:** melanoma, Ki-67, p53, Bcl-2, overall survival, disease-free survival

## 1. INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é uma neoplasia originada da transformação maligna de melanócitos localizados na camada basal da epiderme, sendo originalmente descendentes da crista neural<sup>1</sup>.

Destaque-se que, a principal função da célula é sintetizar e transferir o pigmento melânico aos queratinócitos e desta forma protegê-los dos danos causados pela radiação ultravioleta<sup>1</sup>.

Outro aspecto refere-se à incidência agressiva e crescente do melanoma cutâneo, a qual nos últimos anos obteve um aumento significativo principalmente entre a população branca, apresentando uma distribuição irregular com pico no adulto jovem e outro na velhice, com sobrevida média mundial estimada em 69%. Não há cura efetiva nos pacientes com melanoma disseminado, sendo, portanto, necessário estimar o risco de progressão da neoplasia e o consequente prognóstico destes pacientes, preferencialmente no momento do diagnóstico<sup>1</sup>.

Como muitos cânceres, a predisposição genética e a exposição a fatores ambientais são os principais fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma, salientando que o melanoma apresenta duas fases distintas de crescimento, uma radial e outra vertical, onde o tratamento, a taxa de cura e a sobrevida diminuem significativamente quando há mudança de um crescimento para outro<sup>2</sup>.

Tem-se como fator prognóstico para o melanoma o envolvimento linfonodal, esclarecendo que a maioria dos pacientes apresentam linfonodos clinicamente normais ao diagnóstico, havendo a necessidade de determinar um fator prognóstico microscópico para avaliação da doença<sup>2</sup>.

No final da década de 60, Clark definiu alguns critérios microscópicos baseado na infiltração das camadas da pele (epiderme, derme e gordura) na tentativa de correlacionar com o prognóstico da doença<sup>3</sup>.

Ao início da década de 70, Breslow correlacionou à espessura em mm de infiltração na pele com o risco de metástase, no melanoma cutâneo. Então, o grau microscópico de invasão passou a ser o principal fator prognóstico na doença com linfonodos clinicamente não comprometidos<sup>4</sup>.

Além da espessura do tumor, houve a necessidade de estabelecer outros critérios microscópicos que pudessem interferir na evolução do tumor, onde Clark

no início da década de oitenta propôs que o índice mitótico poderia ser um fator prognóstico associado à espessura do tumor<sup>5</sup>. Em 2001 Balch propôs que a ulceração poderia ser um fator prognóstico independente<sup>6</sup>. Barnhill em 2005 concluiu que o índice mitótico é um fator prognóstico mais importante que ulceração<sup>7</sup>.

Dentre outros fatores preditivos de sobrevida em melanomas cutâneos primários estão presença de ulceração, idade, sexo, localização anatômica, presença ou ausência de lesões satélites, índice mitótico, presença de regressão e infiltrado inflamatório tumoral<sup>8</sup>.

Dados clínicos e histológicos de melanomas cutâneos primários fornecem informações prognósticas úteis, porém o curso clínico desta neoplasia é imprevisível havendo necessidade de fatores adicionais para prever sua evolução<sup>9</sup>.

Recentemente, técnicas de biologia molecular, tem possibilitado a identificação de marcadores que estão sendo investigado na tentativa de estabelecer correlação de expressão com fatores prognósticos atuais, risco de progressão, metástase e sobrevida dos pacientes com melanoma. A combinação de todos estes dados pode facilitar a caracterização de marcadores biológicos e de novas proteínas envolvidas na gênese, desenvolvimento e progressão dos melanomas, ajudando a identificar pacientes que apresentam risco de pior prognóstico e pode também identificar possíveis alvos terapêuticos que auxiliem no tratamento dos pacientes com melanoma cutâneo<sup>9</sup>.

## 1.1 OBJETIVO

Avaliar a correlação da expressão dos marcadores moleculares p53, Bcl-2 e Ki-67 com a sobrevida global e sobrevida livre de doença em pacientes portadores de melanoma cutâneo.

Avaliar a expressão dos mesmos marcadores na população do estudo, estratificando de acordo com a espessura de tumoral de Breslow e índice mitótico.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O primeiro relato de melanoma é achado nas escrituras de Hipócrates (460 a.C.), porém foi descrito pela primeira vez com detalhes em 1806 por René Laennec<sup>10</sup>. Em 1820, Willian Norris correlacionou a possibilidade hereditária do melanoma ao descrever uma família com numerosas lesões pigmentadas e metástases<sup>11</sup>.

Nas últimas quatro décadas sua incidência aumentou mais que a de qualquer outro tumor nos Estados Unidos da América (EUA), apresentando uma distribuição irregular com um pico no adulto jovem e outro na velhice, ocorrendo principalmente em indivíduos com pele fototipo I e II<sup>8</sup>.

Sua sobrevida média mundial é estimada em 69%, sendo responsável por 84% das mortes por câncer de pele, ocupando o segundo lugar em mortalidade entre todos os tipos de cânceres nos EUA<sup>8</sup>.

Os principais fatores prognósticos para o melanoma foram revisados pela American Joint Comite Cancer em uma análise de 17.000 pacientes sendo considerado o mais importante deles o envolvimento linfonodal. A maioria dos pacientes apresenta-se com linfonodos clinicamente normais ao diagnóstico, então o grau microscópico de invasão passou a ser o principal fator prognóstico. Foram descritos dois sistemas de estudo da invasão microscópica: os níveis de Clark e a densidade em Breslow. Os níveis de Clark classificam a invasão de acordo com os sítios anatômicos (epiderme, derme e gordura), enquanto que a densidade em Breslow é a medida absoluta da profundidade do tumor desde a camada mais superficial (camada granular) até a célula tumoral mais profunda, sendo a espessura apresentada em (mm)<sup>8</sup>.

### 2.1 INCIDÊNCIA

De acordo com o *National Cancer Institute* (NCI), Atlanta, a incidência do melanoma cutâneo nos EUA em 2008, foi de 27,58/100 mil pessoas brancas, sendo mais alta em homens (34,07/100 mil) do que em mulheres (23,13/100 mil). Em janeiro de 2008 a prevalência do melanoma nos EUA era de 800.000 pacientes<sup>1</sup>.

A *American Cancer Society* estima que a incidência do melanoma cutâneo cresça 4,1% ao ano, mais rápido do que qualquer outra neoplasia entre a população branca. Ela estima que 68.130 novos casos de melanoma e 8.700 mortes por melanoma ocorram nos EUA em 2011<sup>2</sup>. Segundo a *National Comprehensive Cancer Network*, são estimados 62.480 novos casos de câncer no mundo, sendo que 8.420 pacientes morrerão nos EUA pela doença<sup>8</sup>.

Segundo o *Instituto Nacional de Câncer*, a estimativa para 2010 foi de 5.930 casos novos de melanoma no Brasil, sendo 610 no Paraná e mais precisamente 130 casos novos de melanoma em Curitiba, onde 2.960 casos novos são em homens e 2.970 casos novos em mulheres (Instituto Nacional do Câncer - INCA 2010)<sup>11</sup>.

Apesar, do melanoma cutâneo, ser menos frequente do que os outros tumores de pele (basocelulares e de células escamosas), sua letalidade é mais elevada. Melanomas causam mais de 75% das mortes por câncer de pele. O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom, se detectado nos estágios iniciais. Nos últimos anos houve grande melhora na sobrevida dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do mesmo. Nos países desenvolvidos a sobrevida média estimada em cinco anos é de 73%, enquanto que, para os países em desenvolvimento a sobrevida média é de 56%. A média mundial estimada é de 69%<sup>12</sup>.

## 2.2 FATORES DE RISCO

Exposição intermitente à radiação ultravioleta é o maior fator de risco para o desenvolvimento do melanoma, especialmente em combinação com fatores endógenos, como fototipo de pele I (pele muito clara, sempre queima, nunca bronzeia) e II (pele clara, sempre queima e algumas vezes bronzeiam), estado imune e predisposição genética do indivíduo. Exposição solar intermitente está associada com maior risco de desenvolvimento da neoplasia do que exposição crônica, especialmente em pessoas brancas com exposição solar intermitente durante a infância<sup>13</sup>.

## 2.3 PROGRESSÃO EM MELANOMA

Em 1984, Clark *et al.* propuseram modelo para o desenvolvimento e progressão do melanoma. Este modelo, baseado em características clínicas e histológicas, descreve cinco passos para a progressão desta neoplasia: 1) nevo melanocítico; 2) nevo displásico; 3) melanoma em fase de crescimento radial; 4) melanoma em fase de crescimento vertical; e 5) melanoma metastático<sup>3</sup>.

Contudo, somente 30% dos melanomas primários invasivos são associados com um nevo pré-existente, sugerindo que muitos melanomas não surgem de nevos. A maioria dos nevos melanocíticos aparece após o nascimento (nevos adquiridos) e, baseado em padrões de crescimento, podem ser classificados em juncional, composto ou intradérmico. Nevos melanocíticos podem estar presentes também ao nascimento (nevo congênito). Nevos displásicos diferem dos nevos comuns por apresentarem desordem arquitetural e atipia citológica<sup>13</sup>.

Em lesões cutâneas melanocíticas, a progressão tumoral é definida como um acúmulo gradual de alterações genéticas irreversíveis que resultam em aumento do seu potencial maligno e desenvolvimento de doença metastática e, para fins diagnósticos e prognósticos, é importante identificar marcadores apropriados que diferenciem os estágios da progressão do melanoma, como por exemplo, separar os melanomas finos (em fase de crescimento horizontal/inicial) dos melanomas grossos (fase de crescimento vertical/avançado)<sup>13</sup>.

### 2.3.1 Fase de Crescimento Radial

A maioria dos melanomas se desenvolve, através de um estágio inicial de progressão tumoral, como uma placa achatada que se expande ao longo de um raio de um círculo imperfeito. Devido a esta analogia clínica, esta fase foi denominada de “fase de crescimento radial”<sup>14</sup>.

A fase de crescimento radial pode ser *in situ* (confinada a epiderme) ou *in situ* e invasiva, porém, neste caso, as células não têm capacidade de proliferação na derme. A proliferação na epiderme pode originar um padrão de melanócitos neoplásicos atípicos organizados na forma de células isoladas, agrupadas ou em ninhos. Como nos nevos juncionais, que podem migrar para a derme para formar nevos compostos, as células de um melanoma *in situ* podem migrar para a derme

papilar. Na derme, estas células podem sofrer apoptose e desaparecer ou podem sobreviver sem proliferar, ou seja, as células persistem na derme, mas não se expandem para formar um nódulo tumoral<sup>14</sup>.

### 2.3.2 Fase de Crescimento Vertical

Na próxima fase da progressão, um nódulo tumoral aparece entre os limites de uma placa pré-existente ou surge de novo, uma lesão chamada “melanoma nodular”. A característica principal desta fase de crescimento é a habilidade das células neoplásicas sobreviverem e proliferarem na derme. Esta habilidade é observada através da formação de um nódulo tumoral ou pela presença de atividade mitótica<sup>14</sup>.

Um de dois critérios é suficiente para a classificação dos melanomas em fase de crescimento vertical. O primeiro é chamado tumorigenicidade definido como a presença de grupamentos de células na derme maiores do que o maior grupamento intraepidérmico. O outro é a mitogenicidade, que se refere à presença de qualquer figura mitótica nas células neoplásicas da derme<sup>14</sup>.

## 2.4 FATORES PROGNÓSTICOS

Na última década o melhor entendimento dos fatores prognósticos em melanoma cutâneo, permitiu aos oncologistas oferecerem tratamento apropriado aos seus pacientes. Dentre os fatores preditivos de sobrevida em melanomas cutâneos primários, os mais importantes são a espessura da lesão, a presença de ulceração e o envolvimento de linfonodos. Idade, sexo, localização anatômica e lesões satélites também são importantes. Há ainda fatores sendo investigados, como índice mitótico, presença de regressão, infiltrado inflamatório tumoral, vascularização tumoral, invasão angiolímfática. Espera-se, em futuro próximo, que marcadores moleculares ofereçam mais informações em relação ao prognóstico destes pacientes<sup>14</sup>.

Os melanomas magros (<1 mm) tendem a ter excelente prognóstico com sobrevida maior que 90% em cinco anos em contraste com melanomas espessos (>4 mm com ulceração) e prognóstico relativamente pobre, com 45% de sobrevida em cinco anos<sup>14</sup>.

Todavia, uma minoria de pacientes com melanoma magro morrerá de doença metastática. Para prever a sobrevida nos melanomas, numerosos fatores clínico-patológicos individuais ou multifatoriais foram determinados a fim de tentar correlacionar com o prognóstico da doença. Nos pacientes com linfonodos clinicamente negativos, além da espessura em Breslow existem outros fatores a serem considerados no prognóstico do paciente, como ulceração da lesão, índice mitótico, infiltrado linfocitário peri-tumoral, áreas de regressão da lesão, invasão vascular, idade do paciente, sexo, localização da lesão primária<sup>14</sup>.

A espessura do tumor nos pacientes com linfonodos clinicamente negativos foi considerada por muito tempo como único fator prognóstico importante<sup>15</sup>. Outro fator prognóstico em importância na doença localizada é a ulceração e o índice mitótico<sup>16</sup>.

Uma vez ocorrida metástase para o linfonodo, a sobrevida em cinco anos é de 13 a 69%, dependendo do número de linfonodos afetados e da carga tumoral<sup>17</sup>. O índice de Breslow avalia a espessura da lesão em milímetros desde a camada granular da epiderme até a célula tumoral mais profunda na derme. Quanto maior a espessura da lesão, menor a sobrevida<sup>4, 18</sup>.

O *American Joint Committee On Cancer* estratificou a espessura do melanoma em quatro categorias: menor ou igual a 1,0 mm; 1,01-2,0 mm; 2,01-4,0 mm e maior que 4,01 mm<sup>8</sup>.

Os melanomas com espessura menor ou igual a 1,0 mm são chamados de melanomas finos e os restantes, melanomas grossos<sup>16</sup>. Anteriormente ao índice de Breslow se utilizava o nível de Clark para descrever o envolvimento anatômico do tumor entre as estruturas cutâneas e subcutâneas, sendo dividido da seguinte maneira<sup>3</sup>:

Nível I: crescimento intraepidérmico do tumor, com membrana basal intacta;

Nível II: invasão da derme papilar;

Nível III: preenchimento de toda a derme papilar pelo tumor até a junção derme papilar/derme reticular;

Nível IV: invasão da derme reticular

Nível V: invasão do tecido subcutâneo

Para tumores maiores que 1,0 mm, o nível de Clark não é um fator preditivo de sobrevida independente e tem utilidade limitada<sup>14</sup>.

Posteriormente a espessura tumoral, a ulceração passou a ser estudada como fator prognóstico no melanoma, sendo histologicamente definida como ausência de epiderme intacta sobre uma porção significativa do tumor primário<sup>16</sup>. A ulceração e a espessura tumoral são os dois fatores prognósticos independentes mais importantes e estão correlacionados entre si, segundo Balch, 2001<sup>6</sup>. A incidência de ulceração é maior quanto mais espesso for o tumor primário, variando de 6% a 12,5% para melanomas finos e 63% a 72,5% para melanomas grossos maiores que 4,0 mm. A presença de ulceração diminui a sobrevida dos pacientes seja qual for à espessura do tumor<sup>7</sup>.

Outro fator prognóstico importante, segundo Barnhill *et al* 2005, analisando o número de mitoses em 650 pacientes com melanoma cutâneo, correlacionando fatores clínicos e anatomopatológicos, concluíram que a taxa mitótica é fator prognóstico mais importante do que ulceração. Neste estudo, a taxa mitótica foi dividida em dois níveis de corte: de uma a seis mitoses por mm<sup>2</sup> (índice mitótico moderado) e mais de seis mitoses por (mm<sup>2</sup>)<sup>7</sup>. Estudo anterior de Clark *et al* 1989, já havia relatado que tumores com taxa mitótica igual ou maior do que seis, tem risco 12 vezes maior de apresentarem metástases do que aqueles sem figuras de mitoses<sup>5</sup>. A taxa mitótica é calculada através da contagem do número de mitoses por milímetro quadrado mm<sup>2</sup>. Alta taxa mitótica está relacionada com células com maior capacidade de duplicação, com capacidade de crescer e invadir vasos sanguíneos e linfáticos, e, portanto, pode representar um fator preditivo de mau prognóstico<sup>7</sup>.

Em conjunto com o índice de Breslow, a alta taxa mitótica é um fator preditivo independente de positividade do linfonodo sentinela<sup>19</sup>. A taxa mitótica é um fator preditivo de sobrevida livre de doença objetivo e independente<sup>20</sup>.

#### 2.4.1 Marcadores Moleculares

Dados clínicos e histológicos de melanomas cutâneos primários fornecem informações prognósticas úteis, porém, o curso clínico desta neoplasia é imprevisível e há necessidade de fatores adicionais para prever sua evolução. Marcadores imunohistoquímicos podem melhorar a acurácia prognóstica através da detecção de marcadores biológicos, relacionados à progressão da neoplasia ou ao seu potencial metastático e desta forma fornecer informação para

tratamento mais efetivo e identificar aqueles pacientes que podem se beneficiar de terapêuticas mais agressivas<sup>21</sup>.

O manejo do melanoma cutâneo consiste em uma tarefa problemática, pois as terapias adjuvantes são notoriamente tóxicas, associadas com significativa morbidade. Aliado a isso, os fatores prognósticos clínico-patológicos atuais não prevêm adequadamente a recorrência da doença e a sobrevida em um significativo número de pacientes<sup>9</sup>.

As atuais pesquisas clínicas e moleculares relacionadas à progressão em melanoma cutâneo estão focadas em delinear os tipos precisos de alterações moleculares que ocorrem em cada estágio da progressão desta neoplasia, e em definir o impacto bioquímico e biológico destas alterações nos mecanismos que governam a proliferação, diferenciação e a relação intercelular entre os melanócitos. Este conhecimento pode ser utilizado para um diagnóstico mais efetivo, definição de prognóstico e tratamento dos pacientes com melanoma<sup>22</sup>. Muitos marcadores vêm sendo investigados na tentativa de estabelecer uma correlação da sua expressão com os fatores prognósticos atuais, o risco de progressão, metástase e sobrevida dos pacientes com melanoma<sup>22</sup>.

A descrição do genoma humano, a nova ciência de bioinformática com o desenvolvimento de processos altamente sensíveis e relativamente precisos, altas tecnologias como a microdissecção de captura a laser, espectroscopia de massa, expressão de forma gênica e *microarrays* de tecido estão conduzindo para o conhecimento dos mecanismos moleculares, proporcionando diagnósticos mais fidedignos e administração de novas drogas para o câncer<sup>9</sup>.

O diagnóstico molecular é a descoberta de mutações patogênicas em DNA ou RNA ou proteína associada para ajudar no diagnóstico, subclassificação, prognóstico, seleção de terapia e monitoramento de resposta à terapia. Estas técnicas tornaram-se possíveis devido à abundância de conhecimento criada durante os últimos 50 anos, período em que ocorreram mutações moleculares nos cânceres, como: a regulação do ciclo celular, crescimento e diferenciação celular, apoptose (morte programada da célula); o que estimulou o aparecimento de novas drogas. Os conceitos para uma nova medicina incluem individualização do paciente para uma determinada doença, taxa de progressão da doença, uma vez que cada paciente responde de maneira singular as drogas<sup>23</sup>.

Referindo-se ao melanoma, uma aproximação médica personalizada inclui desde a descoberta de predisposição a doença, diagnóstico precoce, avaliação do prognóstico, descoberta de doença residual mínima, medidas farmacogenômicas da droga, avaliando a eficácia e o risco de efeitos tóxicos para tratamento da doença metastática ao monitoramento do paciente para o retorno do melanoma<sup>23</sup>.

Os eventos moleculares e cromossômicos que diferenciam os melanomas de proliferações melanocíticas benignas incluem a iniciação do tumor (mutações, perda de heterozigidade, amplificação de gene, ganho e perda de cromossomos), crescimento (perda de controle do ciclo celular, fator de crescimento, neovascularização), resistência a apoptose (inativação da morte celular), invasão e metástase (motilidade celular, adesão, enzimas proteolíticas) e escape da vigilância imune (perda ou ganho de reguladores imunes)<sup>24</sup>. Muitos cânceres apresentam mutações afetando o gene supressor tumoral p53, o gene do retinoblastoma, PTEN, ou RAS, porém no melanoma, estes eventos são raros ou acontecem tardiamente na sua progressão, considerando que, na maioria deles, as mutações de BRAF afetam os mitógenos a ativarem a proteína-cinase (MAPK) e a perda funcional de p16 e p14 ARF<sup>25</sup>.

Fundamental é conhecer os principais marcadores moleculares do melanoma para a identificação de indivíduos geneticamente predispostos, além da detecção precoce da doença. Isso é importante já que as chances de cura do melanoma são tanto maiores quanto mais cedo é diagnosticada a doença e iniciado o tratamento<sup>25</sup>. O conceito de marcadores moleculares do melanoma está relacionado a fatores e/ou substâncias que podem identificar a presença ou a predisposição a um tipo de câncer. Esses marcadores podem estar associados a alterações em determinadas regiões genômicas, como mutações em genes de predisposição, bem como, podem estar relacionados à expressão de alguns antígenos em tumores e a presença de substâncias específicas na circulação sistêmica<sup>25, 26</sup>.

Atualmente, não há marcador seguro com 100% sensibilidade e especificidade, capaz de prever a capacidade de metastização do melanoma, seja ele fino ou grosso. No entanto, em casos selecionados, o uso de marcadores correlacionado com a diferenciação, progressão ou ambos além da interpretação em parafina com hematoxilina e eosina (HE), pode ajudar distinguindo um

melanoma de um nevo melanocítico ou outras entidades que sobrepõem com melanoma. Exemplos de fenótipos morfológicos estudados por Ruitter e White 1999, aumentariam a sensibilidade e especificidade do diagnóstico histológico sem prever prognóstico de melanoma incluindo uma análise da fração de crescimento por Ki-67. (MIB-1)<sup>22, 27</sup>.

A fração de crescimento e marcadores de ciclo celular (Ki-67), antígeno de proliferação nuclear, organizador nuclear da fração de fase S correlacionam com progressão e prognóstico. A atividade proliferativa que correlaciona com potencial metastático tem valor prognóstico significativo em vários cânceres. Na progressão de melanoma primário para metastático, o tumor clínico dobra proporcional ao aumento do tempo, e a taxa de mitose do tumor primário estabelece relação com a sobrevida, decrescendo o índice de Ki-67 (MIB-1) e proliferando antígeno nuclear<sup>28</sup>.

Carlson *et al* mostraram que o índice de Ki-67 é um biomarcador útil no prognóstico para progressão do melanoma com sobrevida global diminuída e risco para metástase. Todavia, isto parece estar correlacionado com a densidade do melanoma, onde lesões maiores que 1.5 mm apresentam mais riscos para metástase do que para melanomas magros<sup>29, 30</sup>.

Segundo Leiter *et al*, o Bcl-2 apresenta-se expresso no melanoma humano, de 78 a 100% de casos, um aumento em relação à progressão da doença, porém, sem uma relação com a sobrevida clínica<sup>31</sup>.

#### 2.4.1.1 Ki-67

A atividade proliferativa das células de um tumor é um fator prognóstico comum em neoplasias humanas<sup>32</sup>. O antígeno nuclear Ki-67 é um marcador de proliferação celular, sendo expresso em quase todas as fases do ciclo celular, ausente somente na fase G0<sup>32</sup>. Reddy em 1995, através de um estudo com os marcadores p53 e Ki-67 em melanomas com nível de Clark III-IV com e sem recorrência, mostrou que não havia nenhuma diferença na expressão de p53 e Ki-67 entre pacientes com metástase e pacientes sem metástase<sup>33</sup>.

Moretti *et al* 2001, demonstrou correlação positiva entre a expressão do Ki-67 com o prognóstico da doença, de acordo com a densidade do tumor<sup>34</sup>. Vários estudos informam associação positiva entre a expressão do Ki-67 e sobrevida

pobre em melanoma com Breslow > 4mm<sup>35, 36, 37</sup>. O Ki-67 foi também estudado como marcador de resposta às terapias alvo em estudos clínicos<sup>38</sup>. Väisänen *et al*, em 2011 demonstrou uma maior propensão a metástase e menor sobrevida nos pacientes apresentando expressão mais intensa do Ki-67<sup>39</sup>.

Kaleem *et al*, 2000, em estudo com 253 lesões melanocíticas distribuídas em 76 nevos comuns, 39 nevos de Spitz, 62 melanoma de disseminação superficial, 32 melanomas nodulares, 21 lentigos maligno melanoma e 23 melanomas que surgem em associação com nevos preexistente, cada um apresentou crescimento radial. Foram considerados positivos para Ki-67 ou p53 quando demonstraram reação exclusivamente nuclear. Os casos sem reatividade foram considerados negativos, sendo avaliadas 100 células de tumor em campos microscópicos de 400 vezes em maior aumento. Nenhum nevo comum mostrou expressão menor que 5% para Ki-67 e todos eles eram completamente não reativos para p53. Os nevos de Spitz não apresentaram reação maior que 11% para o Ki-67 e reação negativa para o p53. Usando um modelo com positividade maior que 10% para o Ki-67 e 5% para o p53, 75% dos melanomas na fase de crescimento vertical e 8% na fase radial apresentaram-se positivos para os marcadores<sup>40</sup>. Chorny *et al*, 2003 em estudo com nevos compostos, nevos de Spitz, melanoma de disseminação superficial mostraram que o Ki-67 pode estar expresso em ate 5% nos nevos e 13% nos melanomas finos, sendo seu grau de expressão maior nas lesões malignas<sup>41</sup>.

Pearl *et al*, 2007, estudaram o marcador Ki-67 tentando associar com a progressão no melanoma primário e nas metástases linfonodais em 79 lesões primárias e 92 linfonodos. A expressão elevada do Ki-67 alta, era associada à densidade de Breslow e presença de ulceração em melanoma primário e na metástase de linfonodal, concluindo que a expressão elevada do Ki-67 está associada com progressão do melanoma e envolvimento de múltiplos linfonodos, mostrando assim, pacientes com elevado risco de metástase e progressão de doença<sup>32</sup>.

Ladstein *et al*, 2010, em estudo com 202 pacientes com melanoma nodular, avaliando o índice mitótico e a expressão do Ki-67 com a sobrevida global, revelaram que o aumento do número de mitoses eleva a expressão do Ki-67 estando associada a densidade tumoral (espessura em Breslow), presença de ulceração e necrose tumoral, manifestando que a proliferação de células de tumor

com expressão elevada do Ki-67 teve impacto significativo por análise de multivariada no prognóstico<sup>42</sup>.

#### 2.4.1.2 Bcl-2

A apoptose é uma forma altamente regulada de morte celular com DNA alterado, seja por mutação ou ciclo celular irregular, impedindo a célula a gerar clones celulares irregulares. Uma variedade de genes e proteínas são envolvidos nos passos de iniciação, platô e execução da apoptose, destacando-se o gene *Bcl-2*<sup>43, 44</sup>.

A família dos genes *Bcl-2*, consiste em genes anti-apoptóticos (*Bcl-2*, *Bcl-XL*) e apoptóticos (*Bax* e *Bak*), existindo uma relação *Bcl-2/Bax* ideal de controle e equilíbrio entre a vida e a morte celular<sup>30, 45</sup>.

A expressão alterada das proteínas *Bcl-xl* e *Bcl-2* parecem estar envolvidas tanto na gênese quanto na progressão do melanoma, havendo relatos da expressão aumentada destes genes, levando a um aumento no potencial de malignidade e maior possibilidade de metastização do melanoma<sup>45</sup>.

O *Bcl-2* é expresso em 78 a 100% dos casos de melanoma cutâneo<sup>46, 47</sup> e em várias outras neoplasias<sup>46, 47</sup>. Ordd, 1994 mostrou uma diminuição do *Bcl-2* no melanoma cutâneo<sup>47</sup>, enquanto Cerroni, 1995 mostrou aumento da expressão do *Bcl-2* tanto no melanoma, como nos nevos de pele sem correlação com a sobrevida<sup>45</sup>. Estudos aprofundados sobre os mecanismos moleculares pelos quais o *Bcl-2* controla o ciclo celular nas células tumorais do melanoma vêm sendo propagados com o objetivo de se desenvolver terapias alvo específicas<sup>48, 49</sup>. Há pesquisas que evidenciaram um decréscimo na expressão do *Bcl-2* em melanomas, sugerindo que essa sub-expressão estaria relacionada ao crescimento autônomo característico do melanoma cutâneo<sup>50</sup>.

Divito *et al*, 2004, em estudo com 282 pacientes mostraram que a expressão do *Bcl-2* era mais alta nas lesões primárias do que nas metastáticas e em pacientes com mais de 50 anos de idade. Entre as lesões primárias não havia nenhuma associação entre expressão de *Bcl-2* e profundidade de Breslow e Clark<sup>51</sup>.

Espíndola e Corleta 2008 estudaram a correlação entre o grau de expressão do *Bcl-2* em metástases linfonodais e viscerais e a sobrevida global, em 50

pacientes diagnosticados com melanoma estadios III e IV, sendo a espessura de Breslow média de 5.01 mm onde a expressão do Bcl-2 foi encontrada em 74,3% dos linfonodos metastáticos, 85,7% em metástases subcutâneas e 82,4% nas metástases viscerais. A análise univariada e multivariada não mostrou correlação positiva entre a expressão e sobrevida global<sup>52</sup>.

#### 2.4.1.3 P53

O *p53* é um gene supressor tumoral que codifica uma proteína nuclear conhecida em sua variante normal como proteína P53 tipo-selvagem, possui funções como: participação na captura e indução de G1, inibição da síntese de DNA danificado, indução de apoptose e interação com outras moléculas que participam nestes mecanismos<sup>53</sup>.

O gene *p53* tem um importante papel na morte celular programada. No qual diminui a expressão do *Bcl-2*, induz a apoptose em resposta aos estímulos de genotoxicidade e mantém a estabilidade genômica. A perda destas funções ou por mutações ou através da inativação alélica conduz a um aumento da instabilidade genômica, amplificação do gene e mudanças na ploidia do DNA<sup>53</sup>.

O gene *p53* é frequentemente mutado nas neoplasias humanas, resultando funções alteradas que podem induzir a carcinogênese<sup>54</sup>. No melanoma, as mutações do gene *p53* são raras, acontecendo em menos de 5%, sendo seu papel controverso<sup>54, 55</sup>. Vogt *et al* 1997, apresentaram estudo mostrando a associação entre a expressão do *p53* e o Ki-67 não demonstrando correlação com a sobrevida<sup>28</sup>, sendo favorável a vários autores que não mostraram nenhuma correlação<sup>9, 54, 55</sup>. Recentemente Väisänen *et al*/2011, em um estudo retrospectivo usando os marcadores *p53* e Ki-67, demonstraram positividade para o *p53* em 52% dos casos estando diretamente relacionado à espessura tumoral, onde 42% apresentavam-se positivo com tumores maior que 2 mm de espessura. Em relação ao Ki-67, 68% dos pacientes foram considerados positivos, sendo que 42% com tumores maiores que 2 mm de espessura, onde a expressão foi considerada positiva quando a contagem dos núcleos corados era maior que 10%, demonstrando uma maior propensão a metástase e menor sobrevida nos pacientes expressando os marcadores<sup>39</sup>. Atualmente sabe-se que cerca de 50% de todos os cânceres cutâneos estão mutados, aumentando a frequência para até

90% quando a malignidade surge em pacientes com doença genética recessiva denominada xeroderma pigmentoso (XP)<sup>56</sup>. A exposição à radiação ultravioleta ocasiona alterações nas vias de apoptose *p53*-dependentes, variando conforme seja radiação UVA e UVB. Na radiação UVA o dano ocorre por indução de stress oxidativo, enquanto a radiação UVB induziria mutações diretamente no gene. A participação da via da *p53* no melanoma ainda é controversa<sup>57</sup>.

Alguns estudos demonstram associação significativa entre a expressão da *p53* e espessura do tumor acima de 1,5 mm, nível de Clark IV e V, ulceração, embolização linfática, altos índices mitóticos e baixa sobrevida em cinco anos<sup>57</sup>. Entretanto, outros trabalhos mostram não haver correlação da expressão da *p53* com fatores clínicos e prognósticos<sup>58</sup>.

## 2.5 MELANOMA E MICROARRANJOS TECIDUAIS

O método padrão para análises histopatológicas consiste na preservação do material de estudo em formalina e posteriormente em parafina para realização da microtomia e confecção de lâminas histológicas. Em 1998 foi criado um mecanismo para examinar várias amostras de tecidos diferentes de uma só vez, organizando-os num mesmo bloco de parafina e utilizando pequenos cilindros de tecido. Esses arranjos de tecidos foram referidos como “tissue microarrays”-microarranjos teciduais. Para sua confecção utiliza-se um aparelho com uma agulha acoplada que retira os cilindros de tecidos incluídos em blocos de parafina (bloco doador) que, posteriormente, são rearranjados em um novo bloco (bloco receptor). Dessa maneira, dezenas e até centenas de cilindros de tecidos, podem ser colocados num único bloco de parafina. As lâminas obtidas pela microtomia desse bloco podem ser analisadas pela técnica rotineira de coloração por HE ou por outras técnicas, como a imunohistoquímica<sup>59</sup>.

Para a construção de microarranjos teciduais, as lâminas originais são analisadas e as áreas de interesse para estudo são selecionadas. A seguir, as áreas selecionadas são identificadas nos blocos de parafina originais e um cilindro de tecido cujo diâmetro pode variar de 0,6 mm a 2,0 mm, é retirado dessa área com uma agulha acoplada a um equipamento de precisão disponível comercialmente. Esse cilindro é então introduzido em um novo bloco. Os cilindros dos vários casos são sucessivamente adicionados ao bloco receptor e a posição

de cada caso é identificada em uma planilha com referências da coluna e da linha<sup>60</sup>.

Apesar da utilização desta técnica estar amplamente validada pela literatura e seu uso ser cada dia mais difundido, ainda há poucos modelos de equipamentos (manuais ou automáticos) disponíveis comercialmente devido ao seu custo. A utilização de um modelo alternativo para a construção de microarranjos teciduais já foi descrita no Brasil. A técnica artesanal descrita representou uma alternativa econômica aos equipamentos comerciais e permitiu boa concordância diagnóstica com os cortes de blocos originais corados com HE e com o estudo imunoistoquímico<sup>61</sup>.

Esta técnica já foi utilizada para a avaliação de melanomas cutâneos. A combinação desta com dados clínico-patológicos facilitam a rápida caracterização de marcadores biológicos envolvidos no desenvolvimento e na regulação da progressão do melanoma<sup>62, 63</sup>. Estudo brasileiro do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A C Camargo em São Paulo também utilizou microarranjos teciduais para avaliação de marcadores moleculares em melanoma cutâneo, e, concluiu que esta técnica de pesquisa, permite a avaliação de diversas amostras teciduais simultaneamente em um mesmo experimento, e, facilita a análise combinada da expressão de fatores de proliferação celular e de apoptose<sup>64</sup>.

### 3. MÉTODO

O presente estudo clínico, foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner e foi realizado com pacientes oriundos do Serviço de Pele do Hospital Erasto Gaertner em conjunto com o Laboratório de Anatomia Patológica e apoio do Laboratório Byori.

#### 3.1 GRUPO DE ESTUDO

No período de 2000 a 2006 foram atendidos 586 casos de pacientes com melanoma cutâneo. Para realização deste estudo foram selecionados 41 pacientes, usando os critérios de inclusão e exclusão. As informações clínicas, histológicas, exames de imagem, tratamento e evolução foram coletadas e registradas no modelo de ficha apresentada no Anexo I (GBM)<sup>13</sup>.

##### 3.1.1 Critérios de Inclusão:

- i. Diagnóstico histológico de melanoma cutâneo invasivo.
- ii. Pacientes com material histológico disponível para avaliação no banco de tecidos do HEG.
- iii. Pacientes operados na instituição.
- iv. Pacientes com seguimento mínimo de 12 meses.

##### 3.1.2 Critérios de Exclusão:

- i. Doença linfonodal ou doença sistêmica demonstrada por exames de imagem ao diagnóstico.
- ii. Óbito não relacionado à doença em estudo.
- iii. Perda do seguimento.
- iv. Pacientes com diagnóstico histológico de melanoma *in situ* ao diagnóstico.

#### 3.2 MATERIAL HISTOLÓGICO

##### 3.2.1 Obtenção e Armazenamento do Material

Foram coletados blocos de parafina obtidos com material de biópsia de pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo. Confeccionaram-se blocos de

parafina com representações histológicas de todos os pacientes. O estudo imunohistoquímico foi realizado em lâmina única, de modo a manter as condições de análise constantes. A técnica completa para a montagem dos blocos de *tissue microarray* consistiu nos seguintes passos:

- a) Seleção das áreas nas lâminas coradas em hematoxilina-eosina, que continham lesão melanocítica, sendo essas áreas marcadas com caneta de retro projetor.
- b) Baseando-se nas marcações feitas nas lâminas, foram realizadas as mesmas marcações nos respectivos blocos de parafina. Estes blocos foram denominados doadores.
- c) O bloco de *tissue microarray* conteve colunas que foram identificadas com letras e as linhas com números. Este bloco foi denominado de receptor.
- d) Uma vez montado esse mapa, os blocos doadores foram organizados sequencialmente em bancada anexa àquela da montagem do bloco receptor.

Esta sequência obedeceu a uma ordem de entrada, sendo que cada fragmento recebeu um código constituído por uma letra e um número.

- e) A técnica de confecção dos blocos receptores consistiu em 6 passos:
  - i. Aquecimento da pinça do tipo punch.
  - ii. Penetração da pinça aquecida na área demarcada no bloco doador.
  - iii. Pressão e torção aplicada na pinça para corte e retirada do fragmento do bloco.
  - iv. Retirada da pinça contendo fragmento.
  - v. Retirada do fragmento da pinça.
  - vi. Montagem do bloco receptor.

- a) Os blocos receptores foram cortados à espessura de 4 µm, utilizando um micrótomo Leica 2125 RT e colocados em lâminas sinalizados.

### 3.2.2 Técnica de Imunohistoquímica

- a) Hidratação das lâminas em água corrente;
- b) Bloqueio da peroxidase endógena: banho por 5 minutos em peróxido/metanol;
- c) Lavagem em solução salina tamponada (PBS);

- d) Bloqueio de proteínas: 20 minutos com bloqueador de proteínas (DAKO);
- e) Incubação com os anticorpos:
  - i. anti-Human p53 Protein, DakoCytomation, Clone DO-7 (Denmark); diluição 1:50
  - ii. anti-Human ki67 Antigen, DakoCytomation, Clone MIB-1 (Denmark); read-to-use
  - iii. anti-Human bcl-2 OncoProtein, DakoCytomation, Clone 124 (Denmark); diluição de 1:100
- a) Lavagem em PBS;
- b) Revelação da reação com cromógeno diaminobenzidine (DAB) por 5 minutos;
- c) Lavagem em água corrente;
- d) Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos;
- e) Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- f) Desidratação em álcool, xilol, montagem em meio permanente (meio de montagem sintético para IHQ);

### 3.2.3 Análise Histológica

#### 3.2.3.1 Hematoxilina-eosina

Na análise por hematoxilina-eosina foram avaliados a espessura de Breslow e índice mitótico. Todas as análises foram realizadas por um mesmo patologista, através de um microscópio Olympus Bx 41.

#### 3.2.3.2 Imunohistoquímica

A análise da marcação das células pelos anticorpos foi verificada pela presença ou ausência de imunorreação, com controles interno positivo e negativo para cada reação. (figuras I, II)

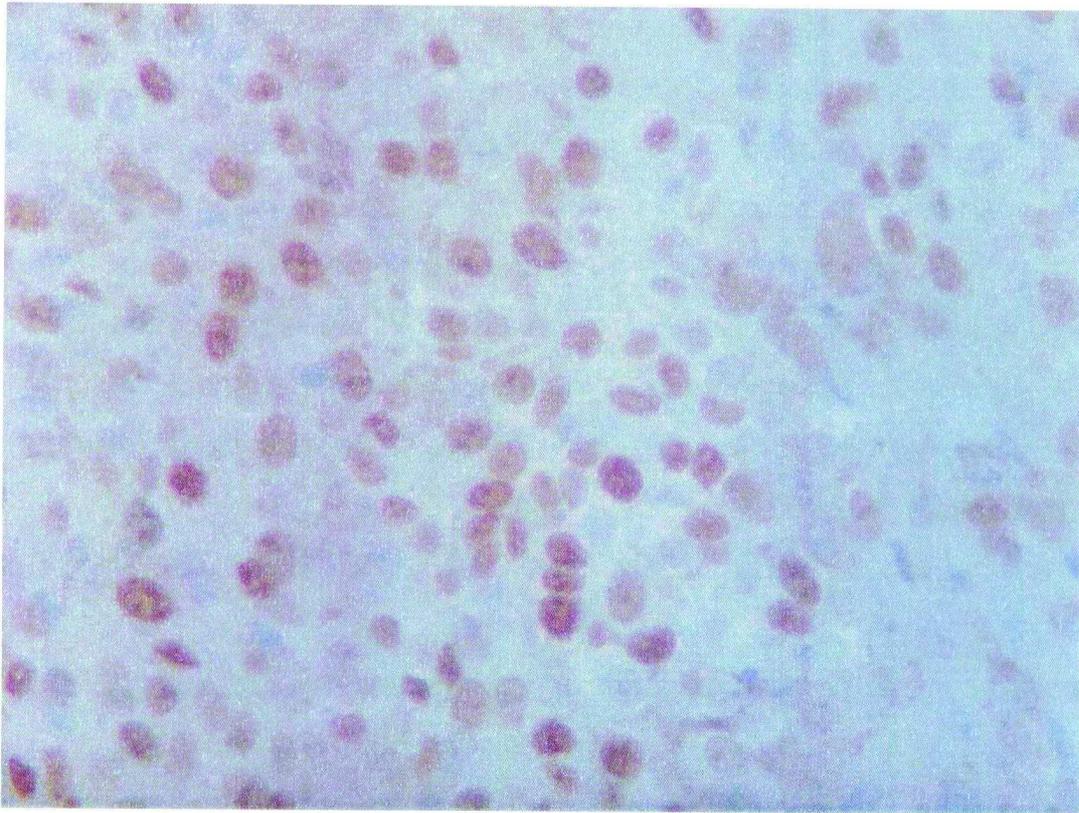


Figura I – fotomicrografia em aumento de 400 vezes mostrando reação positiva com reagente anti-Human Ki-67 Antigen em tecido corado com hematoxilina contendo melanoma cutâneo.

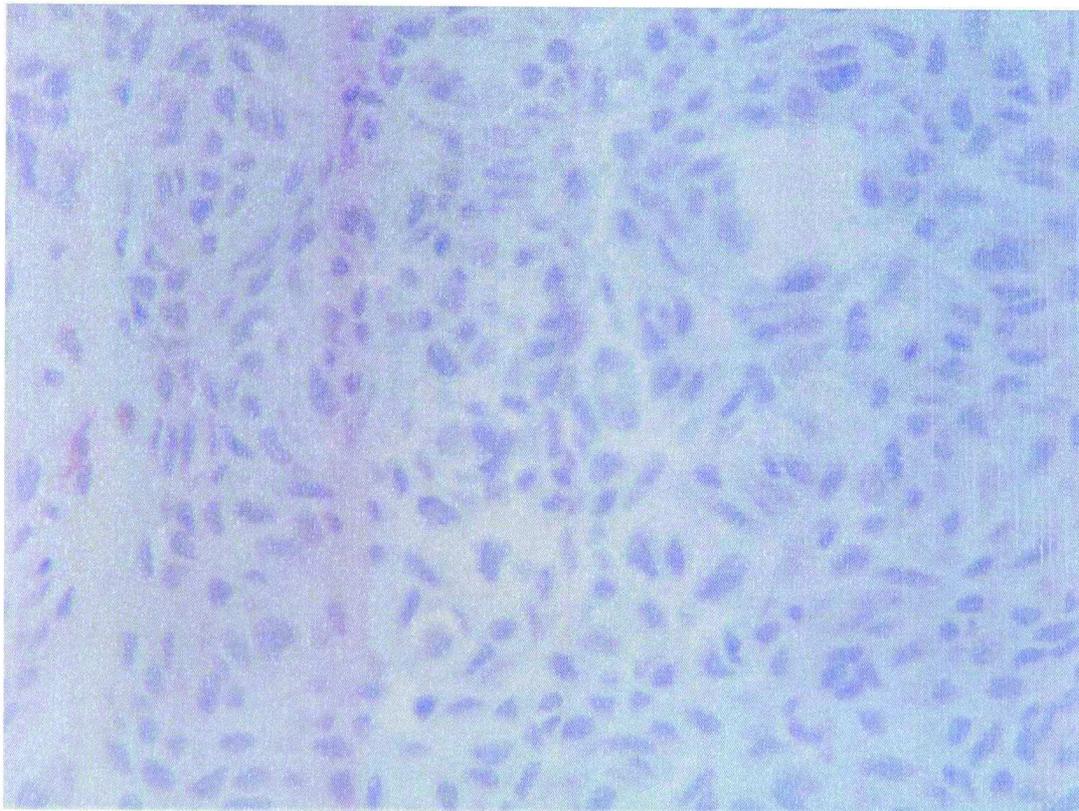


Figura II – fotomicrografia em aumento de 400 vezes mostrando reação negativa com reagente anti-Human Ki-67 Antigen em tecido corado com hematoxilina contendo melanoma cutâneo.

Na revelação dos anticorpos anti-p53, anti-Bcl-2 e anti-ki-67, a coloração amarronada no núcleo das células tumorais, independente da sua tonalidade, indicava detecção positiva. As células foram contadas em campo de 400 x de aumento aleatoriamente pelo mesmo patologista. A presença do p53 e Bcl-2 foram classificadas como positiva ou negativa, e no caso do Ki-67 a expressão dos núcleos positivos foi dada em porcentagem, que por analogia foi definido como negativo quando o marcador foi expresso em menos de 10% e positivo quando expresso em mais de 10% como já descrito por Kaleem<sup>40</sup>.

### 3.3 ANÁLISE DA SOBREVIDA E SUBGRUPOS PROGNÓSTICOS

A análise realizada teve por objetivo verificar a correlação entre a expressão dos marcadores tumorais estudados, com a sobrevida global e sobrevida livre de doença nos subgrupos prognósticos de acordo com o índice de Breslow da lesão primária ( $\leq 1$  mm e  $> 1$  mm) e índice mitótico tumoral ( $\leq 6$  mitoses/campo de maior aumento e  $> 6$  mitoses/campo de maior aumento), conforme figura III.

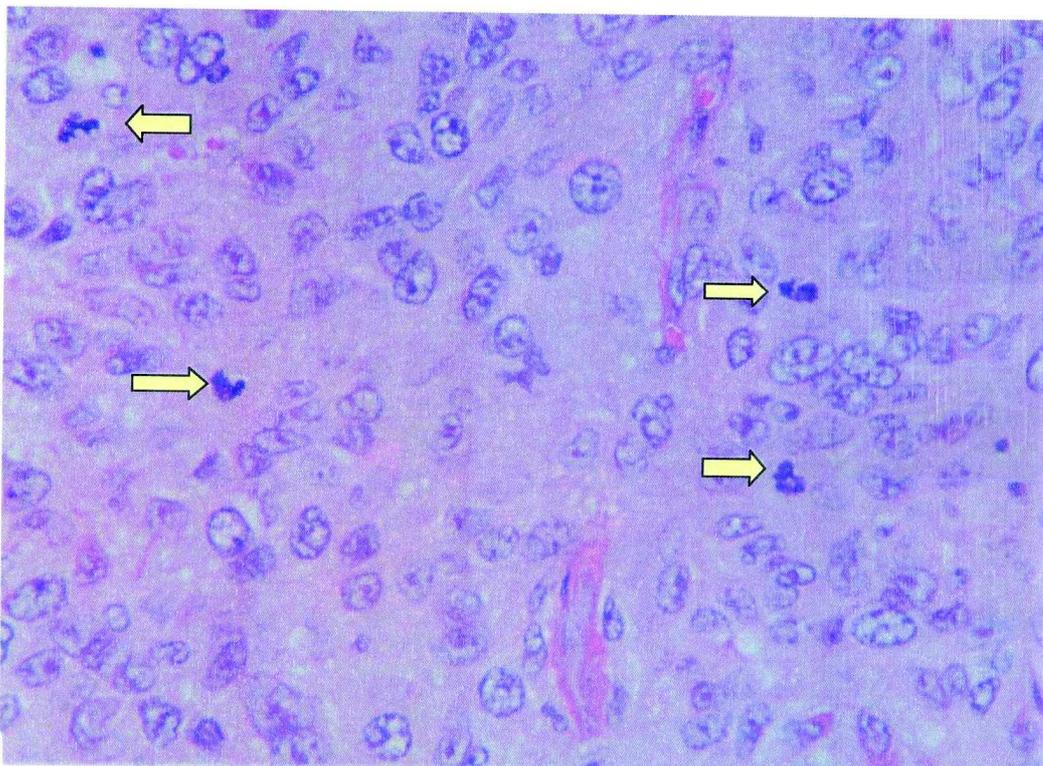


Figura III – Fotomicrografia em aumento de 400x mostrando mitoses em tecido corado com hematoxilina-eosina contendo melanoma cutâneo.

### 3.3.1 Análise Estatística

As informações contidas nos instrumentos de coleta de dados foram digitalizadas em um banco de dados do programa "Microsoft Excel 7.0" e os gráficos foram gerados utilizando-se a mesma planilha eletrônica. Inicialmente realizou-se a análise descritiva das variáveis qualitativas para verificar suas frequências, a média com desvio-padrão foi descrita nas variáveis contínuas. O estudo da sobrevida foi realizado pelos métodos de Kaplan-Meier, teste de log-rank e teste das médias. Para examinar a estatística foi utilizado o software SPSS versão 16.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA). Foram considerados significantes os resultados com  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 GRUPO DE ESTUDO E CARACTERÍSTICAS TUMORAIS

Dos 41 pacientes, a média de idade foi de 53,8 anos  $\pm$  15,3, onde 23 pacientes (56,1%) eram do sexo masculino.

Todos os pacientes apresentavam pele de cor branca. Os tipos mais comuns de melanoma foram o nodular com 41,5%, disseminação superficial 39% acral 12,2% e outros tipos 7,3%. A localização mais frequente de melanoma neste estudo foi no tronco com 48,8%, seguido dos membros inferiores com 29,3%, membros superiores com 17,1% e localizado na cabeça e pescoço 4,9%. A média do tamanho da lesão descrita clinicamente na primeira consulta foi de 3,23 cm com desvio padrão de  $\pm$  2,4 cm. A espessura em mm de Breslow avaliada foi subdividida de acordo com TNM, mostrada na tabela 1.

Breslow	n	%
0 a 1	15	36,6
1.1 a 2	10	24,4
2.1 a 4	6	14,6
4.1 ou +	10	24,4
Total	41	100,0

Tabela 1: Espessura do tumor segundo a AJCC de acordo com a amostra

Fonte: Autor

Também foi avaliada a presença de ulceração, onde 41,5% apresentavam ulceração, enquanto 58,5% não apresentavam. Ainda na descrição anatomopatológica da lesão foi avaliada a fase de crescimento do melanoma, índice mitótico.

Todos os pacientes estudados apresentavam melanoma cutâneo invasivo, onde 36,6% dos casos apresentavam crescimento vertical e 63,4% crescimento radial. Quanto ao índice mitótico, 85,4% apresentavam menos de 6 mitoses/campo e 14,6% mais de 6 mitoses/campo.

Em relação à expressão dos marcadores moleculares, o p53 foi expresso em 93% dos pacientes. Quanto à expressão do marcador Bcl-2, 73% foram

positivos. Já em relação à expressão do Ki-67, 63% foram considerados positivos.

## 4.2 MARCADORES MOLECULARES, SOBREVIDA GLOBAL E SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

No seguimento dos pacientes, 87,4% dos pacientes apresentam-se vivo sem doença, 4,9% vivo com doença e 7,3% em óbito. A sobrevida Global média foi de 32,8 meses de  $\pm 22,74$  e a sobrevida Livre de Doença foi de 31,83 meses  $\pm 22,78$ .

### 4.2.1 p53

As diferenças da sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com a expressão do p53 não foram significantes ( $p=0,583$  e  $p=0,646$ , respectivamente). Os pacientes positivos apresentaram sobrevida global acumulada em 24 meses de  $96,0\pm 3,9\%$  e  $87,5\pm 6,8\%$  em 60 meses (gráfico1), e sobrevida livre de doença em 24 e 60 meses de  $91,0\pm 5,0\%$ . (gráfico 2). Os pacientes com expressão negativa encontravam-se todos vivos e sem doença após 60 meses.

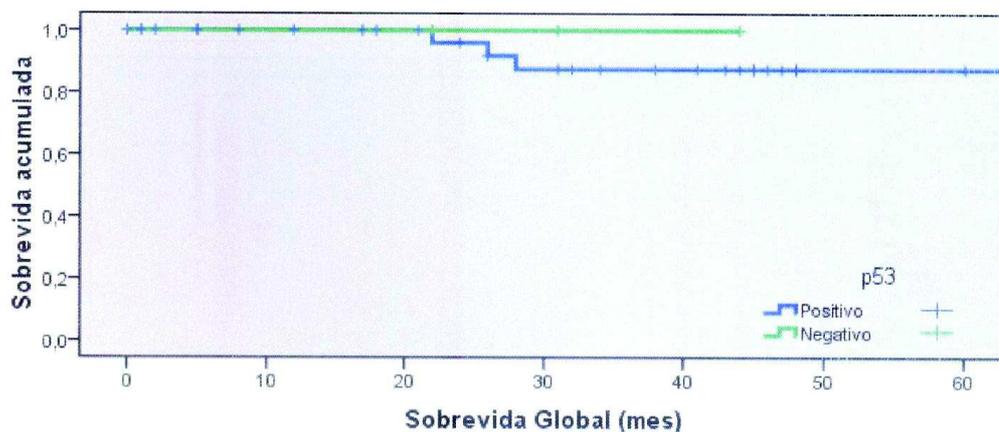


Gráfico 1: Sobrevida global de acordo com a expressão do p53.

Fonte: autor

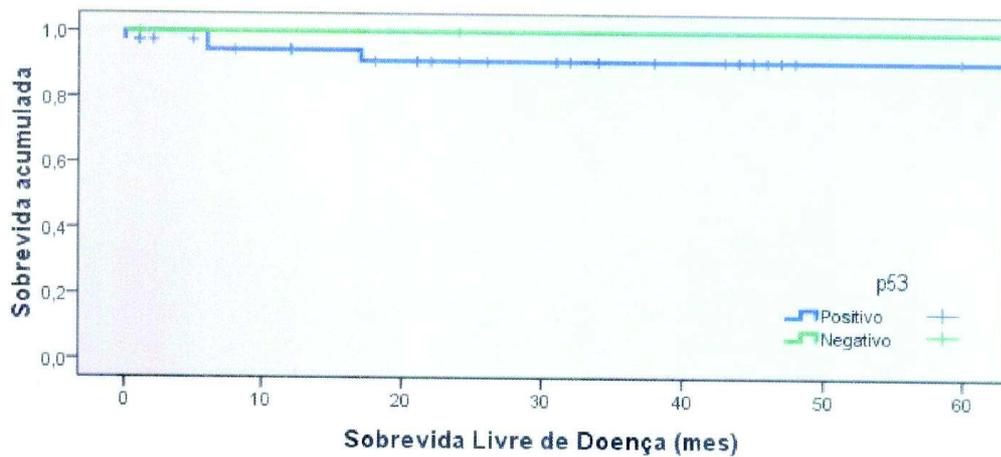


Gráfico 2: Sobrevida livre de doença de acordo com a expressão do p53.

Fonte: autor

#### 4.2.2 Ki-67

As diferenças da sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com a expressão do Ki-67 não foram significantes ( $p=0,118$  e  $p=0,165$ , respectivamente). Os pacientes positivos apresentaram sobrevida global acumulada em 24 meses de  $93,8 \pm 6,1\%$  e  $79,8 \pm 10,5\%$  em 60 meses (gráfico 3), e sobrevida livre de doença em 24 meses de  $89 \pm 3,4\%$  e de  $86,4 \pm 7,4\%$  em 60 meses (gráfico 4). Os pacientes com expressão negativa encontravam-se todos vivos e sem doença após 60 meses.

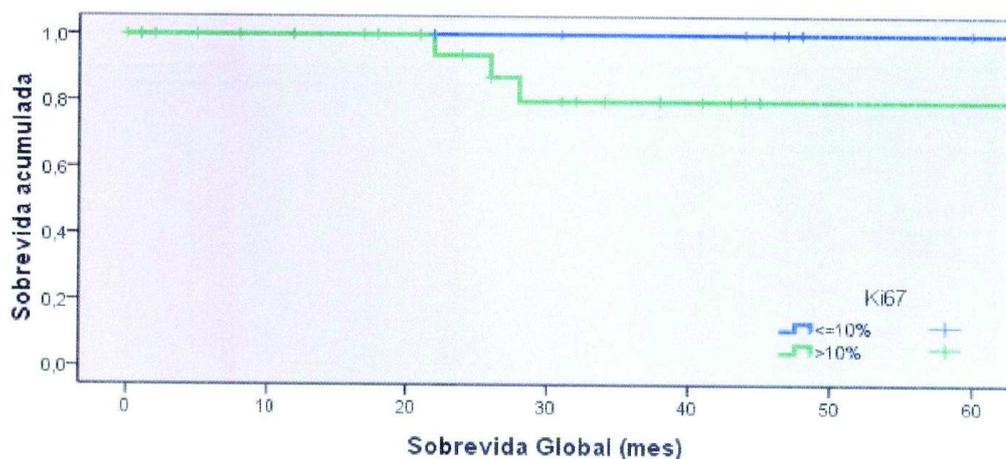


Gráfico 3: Sobrevida global de acordo com a expressão do Ki-67.

Fonte: autor

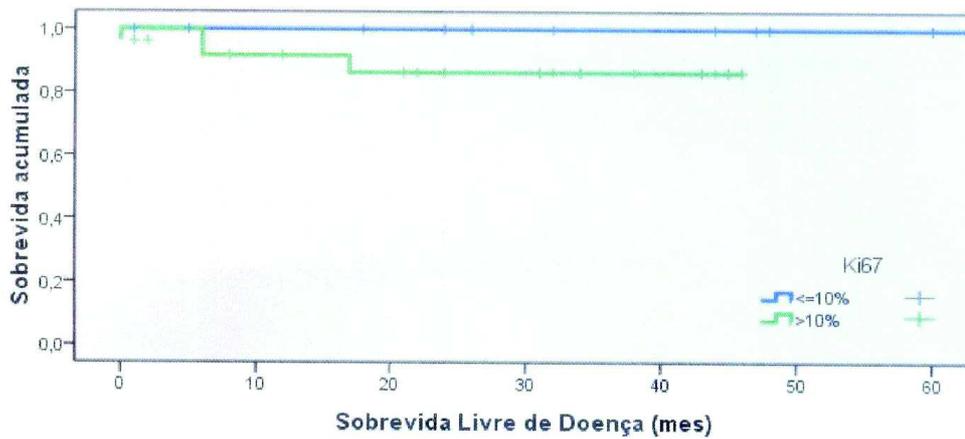


Gráfico 4: Sobrevida livre de doença de acordo com a expressão do Ki-67.

Fonte: autor

#### 4.2.3 Bcl-2

As diferenças da sobrevivida global e sobrevivida livre de doença de acordo com a expressão do Bcl-2 não foram significantes ( $p=0,649$  e  $p=0,852$ , respectivamente). Os pacientes positivos apresentaram sobrevivida global acumulada em 24 meses de  $95,5\pm 4,4\%$  e  $90,4\pm 6,5\%$  em 60 meses (Gráfico 5), e sobrevivida livre de doença em 24 e 60 meses de  $91,4\pm 5,8\%$  em 60 meses (Gráfico 6). Os pacientes com expressão negativa apresentaram sobrevivida global de 100% em 24 meses e  $79,4\pm 3,6\%$  em 60 meses, e todos pacientes vivos encontravam-se sem doença após 60 meses.

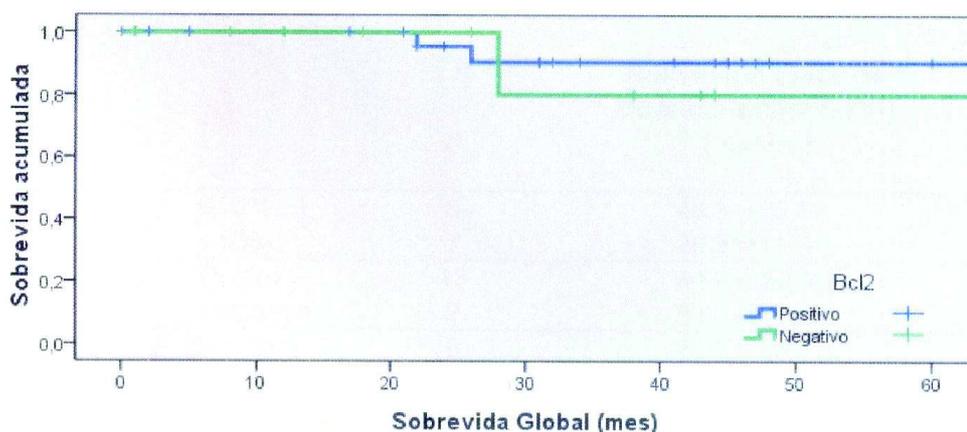


Gráfico 5: Sobrevida Global de acordo com a expressão do Bcl-2.

Fonte: autor

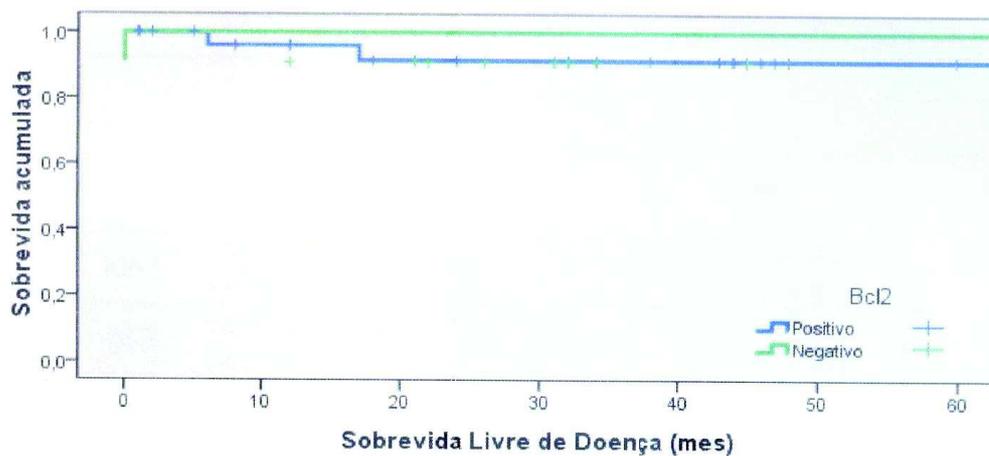


Gráfico 6: Sobrevida livre de doença de acordo com a expressão do Bcl-2.

Fonte: autor

### 4.3 SUBGRUPOS PROGNÓSTICOS

#### 4.3.1 Espessura de Breslow

No subgrupo de pacientes com espessura de Breslow  $\leq 1$  mm na lesão primária, a diferença da média de sobrevivida livre de doença entre os pacientes com expressão negativa do Ki-67 e expressão positiva para o marcador foi estatisticamente significante ( $p=0,0091$ ), e no subgrupo de pacientes com espessura de Breslow  $>1$  mm, houve diferença significativa na sobrevivida global de acordo com a expressão do Ki-67 ( $p=0,0509$ ) (Tabelas 2 e 3).

			<i>n</i>	Sobrevida Livre de Doença Média ( $\pm$ DP) (meses)	<i>p</i>
Breslow $\leq 1$	Ki-67	$\leq 10\%$	8	48,3 ( $\pm 23,21$ )	<b>0,0091*</b>
		$>10\%$	7	36,3 ( $\pm 11,74$ )	
	p53	Positivo	13	44,2 ( $\pm 19,74$ )	0,6348
		Negativo	2	33,0 ( $\pm 15,56$ )	
	Bcl-2	Positivo	9	44,8 ( $\pm 15,71$ )	0,9591
		Negativo	6	39,5 ( $\pm 24,74$ )	
Breslow $>1$	Ki-67	$\leq 10\%$	7	41,1 ( $\pm 31,74$ )	0,2341
		$>10\%$	19	22,0 ( $\pm 17,23$ )	
	p53	Positivo	25	27,0 ( $\pm 23,49$ )	-
		Negativo	1	31,0	
	Bcl-2	Positivo	21	30,6 ( $\pm 23,75$ )	0,6509
		Negativo	5	12,8 ( $\pm 13,29$ )	

Tabela 2: Sobrevida livre de doença de acordo com a espessura tumoral de Breslow e expressão dos marcadores moleculares. Fonte: autor

			<b>Sobrevida Global Média (<math>\pm</math>DP)</b>			
			<b><i>n</i></b>	<b>(meses)</b>	<b><i>p</i></b>	
Breslow $\leq 1$	Ki67	$\leq 10\%$	8	53,3 ( $\pm 21,43$ )	0,2393	
		$> 10\%$	7	22,6 ( $\pm 16,62$ )		
	p53	Positivo	13	37,7 ( $\pm 24,46$ )		0,4619
		Negativo	2	47,0 ( $\pm 32,53$ )		
	Bcl-2	Positivo	9	39,2 ( $\pm 25,60$ )	0,6179	
		Negativo	6	38,5 ( $\pm 25,07$ )		
Breslow $> 1$	Ki67	$\leq 10\%$	7	36,0 ( $\pm 31,29$ )	<b>0,0509*</b>	
		$> 10\%$	19	24,7 ( $\pm 16,07$ )		
	p53	Positivo	25	28,8 ( $\pm 20,85$ )		-
		Negativo	1	1,0		
	Bcl-2	Positivo	21	28,7 ( $\pm 22,68$ )		0,1226
Negativo		5	23,8 ( $\pm 14,08$ )			

Tabela 3: Sobrevida global de acordo com a espessura tumoral de Breslow e expressão dos marcadores moleculares. Fonte: autor

#### 4.3.2 Índice Mitótico

Nos pacientes com índice mitótico  $\leq 6$  mitoses/campo, as diferenças das médias de sobrevida global e sobrevida livre de doença foram estatisticamente significantes entre os pacientes com expressão negativa para o Ki-67 e pacientes Ki-67 positivo ( $p=0,0082$  e  $p=0,0102$ , respectivamente) (tabelas 4 e 5).

			<b>Sobrevida Global</b>		
			<i>n</i>	<b>Média (±DP)</b> (meses)	<i>p</i>
Índice mitótico ≤6	Ki-67	≤10%	11	45,9 (±25,52)	<b>0,0082*</b>
		>10%	24	25,2 (±17,42)	
	p53	Positivo	33	31,4 (±22,75)	0,7116
		Negativo	2	37,5 (±9,19)	
	Bcl-2	Positivo	24	33,7 (±21,57)	0,4434
		Negativo	11	27,4 (±23,90)	
Índice mitótico >6	Ki-67	≤10%	4	42,3 (±33,93)	0,7507
		>10%	2	33,5 (±10,61)	
	p53	Positivo	5	42,8 (±28,75)	-
		Negativo	1	22,0	
	Bcl-2	Positivo	6	39,3 (±27,08)	-
		Negativo	0	-	

Tabela 4: Sobrevida global de acordo com o índice mitótico e expressão dos marcadores moleculares. Fonte: autor

			<b>Sobrevida Livre de Doença Média (±DP)</b>		
			<i>n</i>	(meses)	<i>P</i>
Índice mitótico ≤6	Ki-67	≤10%	11	45,5 (±28,24)	<b>0,0102*</b>
		>10%	24	25,1 (±16,14)	
	p53	Positivo	33	31,3 (±21,44)	0,6348
		Negativo	2	35,5 (±48,79)	
	Bcl-2	Positivo	24	31,4 (±21,27)	0,9591
		Negativo	11	31,8 (±27,21)	
Índice mitótico >6	Ki-67	≤10%	4	44,3 (±31,29)	0,2341
		>10%	2	12,5 (±6,36)	
	p53	Positivo	5	35,6 (±29,55)	-
		Negativo	1	24,0	
	Bcl-2	Positivo	6	33,7 (±26,85)	0,6509
		Negativo	0	-	

Tabela 5: Sobrevida livre doença de acordo com o índice mitótico e expressão dos marcadores moleculares. Fonte: autor

## 5. DISCUSSÃO

O melanoma cutâneo é uma das neoplasias que mais cresce nos EUA, sendo que a maior parcela delas é composta por melanomas finos (<1 mm), o que corrobora a idéia de uma melhoria diagnóstica associada à maior conscientização da população geral. Entretanto, nota-se também um aumento na incidência de tumores em fase avançada, sugerindo um real aumento da doença, o que pode estar associado à exposição solar<sup>13</sup>.

Enquanto os progressos na área terapêutica ainda ficam distantes do ideal, novos métodos diagnósticos e de estadiamento conquistaram seu papel na rotina de investigação. Para os tumores com espessura < 1 mm, a taxa de recorrência é muito pequena, e ainda, os fatores prognósticos utilizados atualmente, no estadiamento do melanoma primário, trazem poucas inovações. Sabe-se que, em torno de 5% das vezes, os casos de melanoma fino evoluem com progressão metastática do tumor, em geral, nos primeiros cinco anos após o diagnóstico. Além da espessura de Breslow outro fator prognóstico relevante é o número de mitoses. Tal fato é creditado a uma possível relação do tamanho nucleolar com a atividade proliferativa<sup>13</sup>.

Tipos de pele 1 e 2, olhos azuis, cabelos ruivos ou loiros, são mais susceptíveis ao melanoma. As influências ambientais contribuem para acentuar o fenótipo constitutivo do indivíduo particularmente as radiações UV do sol. A exposição crônica a estas radiações pode provocar mutações pontuais no oncogene n-ras, induzir imunossupressão, bem como, esgotar os mecanismos de reparo do DNA<sup>13</sup>.

A instabilidade genética e a perda do controle de crescimento estão muito relacionadas quando o DNA é danificado sob efeito de radiação UV. O DNA é, então, reparado pela ação de genes que mantêm a estabilidade genética e se a lesão for irreparável, desencadeia-se um processo de morte celular programada (apoptose). As mutações no gene p53 são observadas em 50% de todos os tumores e estão presentes na pele exposta ao sol, antes mesmo que se observem sinais clínicos. Essas mutações permitem que células com genes defeituosos prossigam no ciclo mitótico de divisão, e, em consequência, haja acúmulo de mutações<sup>13</sup>.

O gene p53 tem papel importante no desenvolvimento do câncer de pele não melanoma, porém não são fundamentais no caso dos melanomas. Os melanócitos transformados, têm alta expressão do gene Bcl-2, que é inibidor da apoptose, e suportam doses de radiação UV mais fortes que os queratinócitos, embora ambos sejam igualmente sensíveis aos efeitos mutagênicos. A fração de crescimento e marcadores de ciclo celular (Ki-67), antígeno de proliferação nuclear, organizador nuclear da fração de fase S podem correlacionar com progressão e prognóstico<sup>13</sup>.

No melanoma, as mutações do gene *p53* são raras, acontecendo em menos de 5%, sendo seu papel controverso<sup>34, 53, 54</sup>.

Sparrow *et al*, 1995, analisando 140 lesões melanocíticas benignas e malignas para expressão de proteína de p53 demonstraram expressão de proteína de p53 em 33% dos nevos, 35% em melanomas primários e 70% em lesões metastáticas demonstrando uma expressão do p53 aumentada em relação à profundidade da lesão primária, porém sem correlacionar com a sobrevida global e livre de doença<sup>54</sup>.

Vogt *et al*, 1997, apresentaram um estudo de 12 casos selecionados de pacientes com melanoma > 3 mm que evoluíram a óbito em menos de 5 anos com caso controle de 12 pacientes já tratados e vivos, mostrando que os pacientes que haviam morrido apresentavam uma maior expressão destes dois marcadores, sem correlação com a sobrevida<sup>28</sup>.

Recentemente Väisänen *et al*, 2011, em um estudo retrospectivo usando os marcadores p53 e Ki-67, demonstraram uma positividade para o p53 em 52% dos casos estando diretamente relacionada a espessura tumoral onde 42% apresentavam-se positivo com tumores maior que 2 mm de espessura. Em relação ao Ki-67, 68% dos pacientes foram considerados positivos, sendo que, 42% são tumores maiores que 2 mm de espessura, onde a expressão foi considerada positiva quando a contagem dos núcleos corados era maior que 10%, demonstrando maior propensão a metástase e menor sobrevida nos pacientes<sup>39</sup>.

Em relação ao Bcl-2, Ramsay *et al* em 1995, estudaram a presença da proteína de Bcl-2 em lesões melanocíticas, sendo 39 nevos e 60 melanomas incluindo 21 metástases, concluindo que proteína de Bcl-2 é expressa em lesões melanocíticas benignas e malignas com perda da expressão em relação a

espessura tumoral, sem correlação com a sobrevida e sobrevida livre de doença<sup>30</sup>.

Divito *et al*, 2004, em um estudo com 282 pacientes mostraram que a expressão do Bcl-2 era mais alta nas lesões primárias que nas metastáticas e em pacientes com mais de 50 anos de idade. Nas lesões primárias não havia nenhuma associação entre expressão de Bcl-2 e profundidade de Breslow e Clark<sup>51</sup>.

Espíndola e Corleta em 2008 estudaram a correlação entre o grau de expressão do Bcl-2 em metástases linfonodais e viscerais e a sobrevida global, em 50 pacientes diagnosticados com melanoma estadio III e IV, sendo a espessura de Breslow média de 5.01 mm onde a expressão do Bcl-2 foi encontrada em 74,3% dos linfonodos metastáticos, 85,7% em metástases subcutâneas e 82,4% nas metástases viscerais. A análise univariada e multivariada não mostrou correlação positiva entre a expressão e sobrevida global<sup>55</sup>. Segundo Anger, em tese de dissertação de doutorado, a expressão alterada das proteínas Bcl-xl e Bcl-2 apresenta mostras de envolvimento tanto na gênese quanto na progressão do melanoma, havendo relatos da expressão aumentada destes genes, levando a um aumento no potencial de malignidade e maior possibilidade de metastização do melanoma<sup>52</sup>.

O Ki-67 é um marcador de proliferação celular sendo expresso em quase todas as fases do ciclo celular, ausente somente na fase G0. Vários estudos informam associação positiva entre a expressão do Ki-67 e sobrevida pobre em melanoma com Breslow > 4 mm<sup>30, 32, 35, 36, 37</sup>. Porém, Reddy *et al* em 1995, através de um estudo com os marcadores p53 e Ki-67 em melanomas com nível de Clark III-IV com e sem recorrência, mostrando que não havia nenhuma diferença na expressão de p53 e Ki-67 entre pacientes com metástase e pacientes sem metástase<sup>33</sup>. Moretti *et al* demonstraram correlação positiva entre a expressão do Ki-67 com o prognóstico da doença, de acordo com a densidade do tumor<sup>34</sup>.

Pearl *et al*, 2007, estudou o marcador Ki-67 tentando associar com a progressão no melanoma primário e nas metástases linfonodais em 79 lesões primárias e 92 linfonodos. A expressão elevada do Ki-67 alta era associada à densidade de Breslow e presença de ulceração em melanoma primário e na metástase linfonodal, concluindo que a expressão elevada do Ki-67 está

associada com progressão do melanoma e envolvimento de múltiplos linfonodos, revelando assim, pacientes com elevado risco de metástase e progressão de doença<sup>32</sup>.

Kaleem *et al* 2000, estudando 253 lesões melanocíticas distribuídas entre nevos comuns, nevos de Spitz, melanoma de disseminação superficial, melanoma nodular, lentigo maligno melanoma e melanomas que surgem em associação com nevos preexistente mostraram que o Ki-67 pode estar expresso em menor intensidade nas lesões benignas, estando expressa principalmente nas lesões malignas com crescimento vertical correlacionando a espessura tumoral, porém sem impacto na sobrevida<sup>40</sup>.

Chorny *et al*, 2003, em estudo com nevos composto, nevo de Spitz, melanoma de disseminação superficial mostrou que o Ki-67 pode estar expresso nas lesões benignas, porém em menor intensidade que no melanoma<sup>41</sup>.

Ladstein *et al*, 2010, em estudo com 202 pacientes com melanoma nodular, avaliando o índice mitótico e a expressão do Ki-67 com a sobrevida global mostrou que o aumento do número de mitoses eleva a expressão do Ki-67, estando associada a densidade tumoral (espessura em Breslow) a presença de ulceração e necrose tumoral, manifestando proliferação de células de tumor com expressão elevada do Ki-67 com impacto de prognóstico significativo por análise de multivariada<sup>42</sup>.

O presente estudo revelou uma expressão do marcador p53 em 93% dos pacientes. A expressão do marcador Bcl 2 foi positiva em 73% dos pacientes e o Ki-67 em 63%. Foi analisada a expressão dos marcadores p53, Bcl-2 e Ki-67 isoladamente em relação à sobrevida global e sobrevida livre de doença, não havendo correlação estatística entre estes marcadores e a sobrevida global e sobrevida livre de doença, sendo favorável a literatura atual vigente.

Em relação à espessura tumoral em Breslow, usando teste de médias o presente estudo mostrou que os pacientes com Breslow < 1 mm e com baixa expressão do Ki-67 apresentaram uma sobrevida livre de doença maior com significância estatística e que os pacientes com Breslow maior que 1 mm e com expressão elevada do Ki-67 apresentaram uma sobrevida global menor, sendo favorável aos estudos de Moretti, Pearl e diferindo do estudo de Chorny.

Quanto ao índice mitótico, o presente estudo mostrou que os pacientes com índice mitótico menor que 6 mitoses e com expressão para o Ki-67, apresentaram sobrevida global e sobrevida livre de doença diminuída com significância estatística, diferindo do estudo de Ladstein.

## **6. CONCLUSÕES**

As expressões dos marcadores moleculares para melanoma cutâneo avaliados neste estudo (p53, Bcl-2 e Ki-67) não exibiram correlação com a sobrevida global e sobrevida livre de doença.

A expressão do marcador Ki-67 expôs uma correlação significativa com as taxas de sobrevida quando a população do estudo foi estratificada de acordo com a espessura tumoral de Breslow e índice mitótico.

## REFERÊNCIAS

1. National Cancer Institut (Bethesda, EUA). Surveillance, Epidemiology and End Results: cancer statistics reiew, 1973-2004. [acesso em 06 maio 2011]. Disponível em [http://seer.cancer.gov/csr/1973\\_1999/](http://seer.cancer.gov/csr/1973_1999/).
2. American Cancer Society (Atlanta, EUA). Melanoma Skin Câncer. [acesso em 12 maio 2011]. Disponível em: <http://www.cancer.org/Cancer/SkinCancer-Melanoma/DetailedGuide/melanoma-skin-cancer-key-statistics>.
3. Clark WH, Elder DE, Guerry DT, Epstein MN, Van Horn MA. Study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol*, 1984; (15):1147-1165.
4. Breslow, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*, 1970 Nov; 172(5):902-8.
5. Clark WH, Elder DE, Guerry D, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J National Cancer Institute*, 1989; (81):1893-1904.
6. Balch, CM, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*, 2001; 9:3635–3648.
7. 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(4):268-273.
8. American Joint Committee On Cancer 2010 Webinar Series - Implementing the Seventh Edition of the AJCC Cancer Staging Manual. [acesso em 06 maio 2011] Disponível em: <http://www.cancerstaging.org/>.
9. Lippincott Williams & Wilkins, Inc. Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in primary and metastatic melanoma. *Melanoma Res*, 2005; 15(5):375-81.
10. Laennec, RTH. 1806. Sur les melanoses. Bulletin de Faculté de Medecine Paris. 1:24.
11. Norris W. A case of fungoid disease. *Edinb Med Surg J*, 1820; 16:562–565.
12. Instituto Nacional Do Câncer (Brasil). Câncer de pele: Melanoma. [acesso em: 12 maio 2011] Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/>.
13. Grupo Brasileiro de Melanoma. [acesso em 05 jan 2011]. Disponível em: <http://www.gbm.org.br>

14. Balch CM, Houghton AN, Sober Aj, Soong SJ. Cutaneous Melanoma, 4th edition. *St. Louis, MO: Quality Medical Publishing, 2003.*
15. Balch CM, Soong SJ, Atkins Mb, Buzaid AC, Cascinelli N, Coit DG, et al. An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. *CA Cancer J Clin*, 2004; 54:131-149.
16. Balch CM, Wilkerson JA, Murad TM; Soong SJ, Ingalls AL, Maddox W. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. *Cancer*, 1980; 45: 3012-3017.
17. Morton DL, et al. Validation of the accuracy of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early-stage melanoma: a multicenter trial. Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial Group. *Ann Surg*, 1999; 230:453-463; discussion 463-465.
18. Breslow A. Prognosis in cutaneous melanoma: tumor thickness as a guide to treatment. *Pathol Annu*, 1980; (15):1-22.
19. Sondak VK, Taylor JM, Sabel MS, Wang Y, Grover AC, Chang AE, Yahanda, AM, Moon J, Johnson, TM. Mitotic rate and younger age are predictors of sentinel lymph node positivity: lessons learned from the generation of a probabilistic model. *Ann Surg Oncol*, 2004; 3(11):233-235.
20. 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):169-177.
21. Martinez, SR, Hoon DS. Molecular markers in malignant cutaneous melanoma: gift horse or one-trick pony? *J Cell Biochem*, 2005; 3(96):473-483
22. Ruiter DJ, Van Muijen GN. Markers of melanocytic tumour progression. *J Pathol* 1998; 186:340-2.
23. Carlson JA, Slominski A, Linette GP, Mysliborski J, Hill J, Mihm Jr MC, Et Al. Malignant melanoma. *Am J Clin Pathol* 2003; 120 Suppl. 1:S101-S127.
24. Barth A, Wanek LA, and Morton DL. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg*, 1995; 181:193–201.
25. Chudnovsky, Y; Khavari, PA; Adams, AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics, *J Clin Invest*, 2005; 115(4):813.
26. Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene*, 2003; (22):3042-3052.

27. White WL. Immunomicroscopy in diagnostic dermatopathology: an update on cutaneous neoplasms. *Adv Dermatol*, 1999; 14:359-97.
28. Vogt T, Zipperer K-H, Vogt A, Hölzel D, Landthaler M, Stolz W. p53-protein and Ki-67 antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin. *Histopathology*, 1997; 30:57–63.
29. Ramsay JA, From L, Iscoe NA, Kahn HJ. MIB-1 proliferative activity is a significant prognostic factor in primary thick cutaneous melanomas. *J Invest Dermatol*, 1995; 105:22–26.
30. Carlson JA, Ross JS, Slominski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, Mihm M Jr. Molecular diagnostics in melanoma; *Am Acad Dermatol*, 2005;52:743-75.
31. Leiter U, Schmid RM, Kaskel P, Peter RU, Kra“Hn G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch Dermatol Res*, 2000; 292:225–232.
32. Pearl R. Pacifico, M.; Richmann, P.; Stott, D.; Wilson, G., Grobelaar, A. Ki-67 expression in melanoma. A potential method of risk assessment for the patient with a positive sentinel node. *Journal of Experience Clinical Cancer Research*, (26):109, 2007.
33. Reddy VB, Gattuso P, Aranha G, Carson HJ. Cell proliferation markers in predicting metastases in malignant melanoma. *J Cutan Pathol*, 1995; 22:248–254.
34. Moretti S, Spallanzani A, Chiarugi A, Fabiani M, Pinzi C. Correlation of Ki-67 expression in cutaneous primary melanoma with prognosis in a prospective study: different correlation according to thickness. *J Am Acad Dermatol*, 2001; 44:188–192.
35. Cattoretti G, Becker Mhg, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 to 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168:357-363.
36. Böni R, Doguoglu A, Burg G, Muller B, Dummer R. Mib-1 immunoreactivity correlates with metastatic dissemination in primary thick cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 1996; 35:416–418.
37. Hazan C, Melzer K, Panageas KS, Li E, Kamino H, Kopf A, et al. Evaluation of the proliferation marker MIB-1 in the prognosis of cutaneous malignant melanoma. *Cancer*, 2002; 95:634–640.

38. Smalley K, Haass N, Medina C, Herlyn M. Ki67 expression levels are a better marker of reduced melanoma growth following MEK inhibitor treatment than phospho-ERK levels. *Brit J Cancer*, 2007; 96: 445-449.
39. Vaisanen A, Kuvaja P, Kallioinen M, Hujanen TA prognostic index in skin melanoma through the combination of matrix metalloproteinase-2, Ki67, and p53. *Human Pathology*, 2011, *in press*.
40. Kaleem Z, Lind A N, *et al*. Concurrent Ki-67 and p53 Immunolabeling in Cutaneous Melanocytic Neoplasms: An Adjunct for Recognition of the Vertical Growth Phase in Malignant Melanomas? *Mod Pathol* 2000, 13(3):217-222.
41. Chorny JA Barr RJ; *et al*. Ki-67 and p53 Expression in Minimal Deviation Melanomas as Compared with Other Nevomelanocytic Lesions *Mod Pathol* 2003; 16(6):525–529.
42. Ladstein R, Bachmann I, Straume, O, Akslen, L Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitosin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *BMC Cancer*, 2010;10:140.
43. Oltvai Zn, Milliman Cl, Korsmeyer Sj. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993, 74:609–619.
44. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*, 1994; 124:1–6.
45. Cerroni L, Soyer Hp, Kerl H. Bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi. *Am J Dermatopathol*,1995; 17:7-11.
46. Ramsay JA, From L, Kahn HJ. Bcl-2 protein expression in melanocytic neoplasms of the skin. *Modern Pathol*,1995; 8:150–154.
47. Oord JJ, Vandeghinste N, De Ley M, De Wolf-Peeters C. Bcl-2 expression in human melanocytes and melanocytic tumors. *É J Pathol*, 1994; 145:294-300.
48. Hussein MR, Haemel AK, Wood Gs. p53-related pathways and the molecular pathogenesis of melanoma. *Eur J Cancer Prev*, 2003; 12:93–100.
49. Eberle J, Hossini A. Expression and Function of Bcl-2 Proteins in Melanoma. *Current Genomics*, 2008; 9: 409-419.
50. Anger M. Expressão das proteínas da apoptose em melanoma cutâneo primário [dissertação de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008.

51. Divito K A, Dolled-Filhart M, Camp R, Berger A, Rimm D. Evaluation of Bcl-2 expression in melanoma - A tissue microarray study. Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition), 2004. *J Clin Oncol*, 2004; 22 14 Suppl 154: 7515.
52. Espíndola, M.; Corleta, O. bcl-2 expression is not associated with survival in metastatic cutaneous melanoma: A historical cohort study. *World Journal Of Surgical Oncology*, 2008; (6):65.
53. Hollstein M, Soussi T, Thomas G, Von Brevern MC, Bartsch H. P53 gene alterations in human tumors: perspectives for cancer control. Recent results *Cancer Res*, 1997; 143:369-389.
54. Sparrow LE, Soong R, Dawkins HJS, Iacopetta BJ, Heenan PJ. p53 gene mutation and expression in naevi and melanomas. *Melanoma Res* 1995; 5:93-100.
55. Mangini J, LI N, Bhawan J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 2002; 24:270–281
56. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133:1710–1715.
57. Ricaniadis, N; Kataki, A; Agnantis, N; Androulakis, G; Arakousis ,CP. Long – term prognostic significance of HSP-70, c-myc and HLA-DR expression in patients with malignant melanoma. *Eur J Surg Oncol.*, 2001;1(27):88-93
58. CASCINELLI,N. Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*, 1996;77: 1303-1310.
59. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Ärlund M, Scraml P Leighton S Torhorst J, Mihatsch M J Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 1998; 4(7):767-768.
60. Rocha RM, Andrade VP, Nunes CB, Rocha GFS Sanches, FSF, Oliveira, F.N.; Gobbi,H. Construção de arrays de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo imuno-histoquímico de tumores mamários. *J Bras Patologia*, 2006;6 (42):477-482.
61. Kielhorn E, Provost E, Olsen D, D'aquila, TG; Smith, BL, Camp,RL Rimm, I. Tissue microarray-based analysis shows phospho- $\beta$ -catenin expression in malignant melanoma is associated with poor outcome. *Int J Cancer*, 2003; 103: 652-656, 2003.
62. Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez, B, Sánchez L, Acuña, MJ Pajares R, Martinez-Tello FJ, Hortelano CM, Piris, MA, Rodriguez-Peralto, JL Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct

expression profiles:a tissue microarray-based study. *Am J Opathology*, 2004; 164:193-203.

63. Sá BC, Landmang. Expressão de fatores de proliferação e apoptose celular em melanomas cutâneos extensivos superficiais. *Melanoma- Boletim Informativo do Grupo Brasileiro de Melanoma*, 2006; 35(4).

64. Miracco C, Santopietro R, Biagioli M, Lazzi S, Nyongo A, Vatti R, et al. Different patterns of cell proliferation and death and oncogene expression in cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol*, 1998; 25:244-251.

## ANEXOS

### 1. Identificação:

- Idade ao diagnóstico:..... anos
- sexo: ( ) M ( ) F
- cor: ( ) B ( ) A ( ) parda ( ) negro

### 2. Tumor na admissão:

- tipo: ( ) superficial ( ) nodular ( ) acral ( ) LMM
- localização: ( ) MS ( ) MI ( ) Tronco ( ) C/P
- tamanho:.....cm
- ulceração clínica: ( ) sim ( ) não ( ) não avaliado
- regressão clínica: ( ) sim ( ) não ( ) não avaliado
- satelitose: ( ) sim ( ) não
- metástase em trânsito: ( ) sim ( ) não
- metástase a distância: ( ) sim ( ) não

Local:.....

### 3. Histologia da lesão Primária:

- tipo: ( ) superficial ( ) nodular ( ) acral ( ) LMM ( ) outros:.....
- invasão: ( ) in situ ( ) invasivo
- fase de crescimento: ( ) vertical ( ) radial ( ) não avaliado
- Breslow:.....mm
- índice mitótico:.....10 campos de 400x ( ) não avaliado
- regressão: ( ) sim ( ) não ( ) não avaliado
- ulceração: ( ) sim ( ) não ( ) não avaliado
- invasão vascular/linfática: ( ) sim ( ) não ( ) não avaliada
- invasão perineural: ( ) sim ( ) não ( ) não avaliada
- infiltrado inflamatório peritumoral: ( ) sim ( ) não ( ) não avaliada

### 4. terapêutica:

- 1ª cirurgia: ( ) na instituição ( ) outra instituição

Ressecção: margem:.....cm

Biópsia incisional ( )

Biópsia excisional ( ) até 2mm

Margem comprometida ( )

- 2ª cirurgia: SOMENTE NA INSTITUIÇÃO

Ressecção completa ( )

Ampliação após excisão prévia ( )

Margens:.....cm

Ressecção + linfadenectomia ( )

Ressecção + linfonodo sentinela ( )

Outros:.....

- locorregional:

Linfonodo sentinela: ( ) sim ( ) não

( ) positivo ( ) negativo

Linfadenectomia: ( ) nódulos clinicamente positivos

( ) LNS positivo

6. Super-expressão dos marcadores:

Ki 67: ( ) sim ( ) não

Bcl-2: ( ) sim ( ) não

P53: ( ) sim ( ) não

7. Evolução:

- vivo ( ) ( ) óbito data:.....

sem doença ( ) com doença ( )

tempo de intervalo livre de doença:.....

doença: ( ) local ( ) sistêmica

## PARECER CONSUBSTANCIADO

No dia 18 de dezembro de 2007, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner avaliou o projeto intitulado como: “**Avaliação Prognóstica dos Marcadores Ki-67, BCL-2 e P-53 no Melanoma Cutâneo Primário Intermediário**”, P.P. nº 1628 cujo pesquisador principal é **Dr. Leandro Carvalho Ribeiro**, médico do Serviço de Pele do Hospital Erasto Gaertner e mestrando em Clínica Cirúrgica pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná, tendo o seguinte parecer:

**OBJETIVOS:** Estudar a super-expressão dos genes de proliferação celular Ki-67, BCL-2 e P53 no melanoma cutâneo primário intermediário com Breslow entre 1 e 4, isolados ou associados aos outros fatores prognósticos, correlacionando com a sobrevida e o intervalo livre de doença.

**SUMÁRIO DO PROJETO:** Serão coletados blocos de parafina de espécimes cirúrgicos de pacientes submetidos à biópsia excepcional com diagnóstico prévio de melanoma primário. A coleta será realizada durante o período de janeiro de 2008 a maio de 2008, no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Erasto Gaertner após análise dos prontuários e preenchimento completo do protocolo. Será utilizado o método *tissue microarray*.

## PARECER: APROVADO

Atenciosamente,

**Coordenador do CEP**  
**Dr. Jordan Zanetti Silva**

---

### Membros do CEP:

Ana Paula Hey – Enfermeira  
Andréa Wulf Pereira de Melo Tratch – Enfermeira  
Angelita Visentin – Enfermeira  
Ariovaldo Donizetti de Abreu – Fisioterapeuta  
Clarice Nana Yamanouchi – Médica  
Daniel Cury Ogata - Médico  
Edenice de Oliveira Santana – Enfermeira  
Fabricio Augusto Martinelli de Oliveira - Médico  
Francisco José Koller - Enfermeiro

Gyl Henrique Albrecht Ramos – Médico  
Iolanda de Assis Galvão – Psicóloga  
Jordan Zanetti Silva – Médico e Advogado  
Jose Carlos Wiederkehr – Administrador de Empresas  
Luiz Antonio Negrão Dias - Médico  
Márcia Bobak - Enfermeira  
Mônica de Fátima Maciel da Rosa - Nutricionista  
Paola Andréa Galbiatti Pedruzzi – Médica  
Wanda Aparecida Silva – Representante da Comunidade

Curitiba, 18 de dezembro de 2007.

**Dr. Leandro Carvalho Ribeiro**  
**Pesquisador Responsável**

Prezado Pesquisador,

Gostaríamos de informar que o projeto de pesquisa intitulado como “**Avaliação Prognostica dos Marcadores Ki-67, BCL-2 e P-53 no Melanoma Cutâneo Primário Intermediário**”, cujo número de protocolo é **P.P. nº 1628** e tem como pesquisador responsável V. Sa. foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e **Aprovado**

Solicitamos que seja enviado um relatório semestral informando sobre o andamento do projeto e ao término do trabalho um relatório final, para darmos fechamento ao projeto. Cada alteração realizada no projeto deve ser comunicada imediatamente ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Sem mais agradecemos a atenção e colocamo-nos a disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente,

Atenciosamente,

**Coordenador do CEP**  
**Dr. Jordan Zanetti Silva**

---

**Membros do CEP:**

Ana Paula Hey – Enfermeira  
Andréa Wulf Pereira de Melo Tratch – Enfermeira  
Angeita Visentin – Enfermeira  
Ariovaldo Donizetti de Abreu – Fisioterapeuta  
Clarice Nana Yamanouchi – Médica  
Daniel Cury Ogata - Médico  
Edenice de Oliveira Santana – Enfermeira  
Fabrício Augusto Martinelli de Oliveira - Médico  
Francisco José Koller - Enfermeiro

Gyl Henrique Albrecht Ramos – Médico  
Iolanda de Assis Galvão – Psicóloga  
Jordan Zanetti Silva – Médico e Advogado  
Jose Carlos Wiederkehr – Administrador de Empresas  
Luiz Antonio Negrão Dias - Médico  
Márcia Bobak - Enfermeira  
Mônica de Fátima Maciel da Rosa - Nutricionista  
Paola Andréa Galbiatti Pedruzzi – Médica  
Wanda Aparecida Silva – Representante da Comunidade

# APÊNDICES

prontuario	bloco de parafina	idade	sexo	cor	tipo	localização	tamanho (mm)	metastase	invasão	fase cresc	Breslow(m)	índice mitótico	Ki 67	Bcl2	p53	Evolução	recidiva	sobrevida (meses)	Intervalo (meses)
2000715	201086B	50	2	1	2	3	1,6	4	2	2	0,68	5	1%	POSITIVO	positivo	1	3	60	
2005416	204007B	64	1	1	1	3	2	4	2	1	2	1	5%	POSITIVO	positivo	1	3	47	
1004337	106642B	58	2	1	5	1	4	4	2	2	0,21	4	10%	negativo	positivo	1	3	82	
1000909	102043B	40	2	1	1	3	1	4	2	2	0,3	0	10%	positivo	positivo	1	3	48	
1000881	101123B	40	2	1	2	1	1,8	4	2	2	1,92	5	10%	POSITIVO	positivo	1	3	86	
2009879	207266B	76	1	1	5	2	8	4	2	2	0,28	4	10%	positivo	positivo	1	1	48	21
2011316	206345B	44	1	1	2	3	2,6	4	2	2	0,5	1	5%	POSITIVO	negativo	1	3	44	
2010907	300373B	62	1	1	1	3	9,6	4	2	2	0,6	10	5%	positivo	positivo	1	3	70	
2011151	300767B	73	1	1	2	2	6	4	2	1	9,1	16	7%	POSITIVO	POSITIVO	3	2	5	4
2001117	202922B	63	2	1	2	1	2	4	2	1	5	15	5%	POSITIVO	POSITIVO	1	3	72	
3004058	303582B	45	1	1	2	3	3	4	2	2	1,3	2	15%	positivo	positivo	1	3	63	
3000376	301432B	24	1	1	1	3	2	4	2	2	1	3	40%	negativo	positivo	1	3	18	
3013143	401813B	73	2	1	1	3	4	4	2	2	1,2	3	5%	POSITIVO	POSITIVO	1	3	46	
3013351	401339B	50	1	1	2	3	3	4	2	1	6	4	30%	POSITIVO	positivo	1	3	45	
3004327	304211B	23	1	1	1	2	2,5	1	2	1	7	6	50%	negativo	positivo	4	3	28	16
3003663	303034B	42	1	1	1	1	1,7	4	2	2	1,3	2	90%	POSITIVO	POSITIVO	1	3	5	
3010676	307267B	52	1	1	2	4	3,5	4	2	1	7,5	5	57%	POSITIVO	POSITIVO	3	2	31	
3004168	306004B	46	2	1	2	3	1,5	4	2	1	4	10	80%	POSITIVO	positivo	3	3	26	22
4013967	408280B	41	1	1	2	2	2,3	4	2	1	5	3	98%	POSITIVO	POSITIVO	1	3	0	
4010496	407169B	57	2	1	2	2	2,5	4	2	2	0,3	5	88%	negativo	POSITIVO	1	3	43	
4012850	500978B	82	1	1	3	2	3	4	2	2	3	10	30%	positivo	POSITIVO	1	1	41	4
4007048	405584B	74	2	1	3	2	3,5	4	2	2	0,9	2	70%	POSITIVO	POSITIVO	1	3	45	
4003814	403117B	50	2	1	1	2	3	4	2	2	1,2	3	27%	positivo	POSITIVO	1	3	17	
4012817	407663B	54	1	1	1	3	2,5	4	2	2	0,91	6	50%	negativo	positivo	1	3	44	
4005040	402752B	78	1	1	1	3	2,5	4	2	2	0,41	0	1%	negativo	positivo	1	3	12	
4014468	500363B	46	2	1	1	3	2	4	2	2	1,25	5	60%	negativo	POSITIVO	1	3	8	
4000556	400345B	36	1	1	1	3	1,5	4	2	1	2,25	4	60%	POSITIVO	positivo	1	3	2	
4000730	400381B	78	1	1	1	3	3	4	2	2	1,2	3	75%	negativo	positivo	1	3	1	
4001312	400635B	47	1	1	1	3	14	4	2	2	0,94	4	60%	positivo	POSITIVO	1	3	45	
4008124	404910B	75	1	1	3	4	1,2	4	2	1	3	4	90%	negativo	POSITIVO	1	3	26	
4008402	406086B	27	1	1	2	3	4	4	2	1	13	3	4%	negativo	POSITIVO	1	1 21 dias		46
5006343	506397B	55	1	1	3	2	5	4	2	2	2,57	5	negativo	POSITIVO	negativo	1	3	31	
5004410	506077B	57	1	1	1	3	1,5	4	2	2	0,61	2	60%	negativo	POSITIVO	1	3	38	
5006107	507590B	49	2	1	3	2	5	4	2	2	0,97	7	negativo	POSITIVO	negativo	1	3	22	
5004649	505747B	52	2	1	2	2	1,5	4	2	1	2,37	5	60%	positivo	positivo	1	3	12	
5002408	502454B	73	2	1	2	1	2,5	4	2	1	6	3	18%	POSITIVO	POSITIVO	1	3	34	
5006010	505460B	47	2	1	2	2	3	4	2	1	4,2	2	15%	POSITIVO	positivo	1	3	32	
5004914	506319B	29	1	1	2	3	3,5	4	2	1	14	2	80	POSITIVO	POSITIVO	4	2	22	6
5003671	505003B	59	2	1	2	1	2	4	2	2	1,8	3	20%	POSITIVO	POSITIVO	1	3	1	
6006151	608496B	64	2	1	5	1	2	4	2	2	0,9	5	98%	POSITIVO	POSITIVO	1	3	21	
6003054	603180B	53	2	1	1	3	1,5	4	2	2	1,27	2	70%	positivo	positivo	1	3	24	

## Legenda

### 1. Identificação:

Numero prontuario (coluna A)

- Idade ao diagnóstico:..... anos (col B)

- sexo: ( 1 ) M ( 2 ) F (col C)

- cor: ( 1 ) B ( 2 ) A ( 3 ) parda ( 4 ) negro

(5) outros (col D)

### 2. Tumor na admissão:

- tipo: ( 1 ) superficial ( 2 ) nodular ( 3 ) acral ( 4 ) LMM (5) outros (col E)

- localização: ( 1 ) MS ( 2 ) MI ( 3 ) Tronco ( 4 ) C/P (5) outros (col F)

- tamanho:.....cm (col G)

- ulceração clínica: ( 1 ) sim ( 2 ) não ( 3 ) não avaliado (col H)

- regressão clínica: ( 1 ) sim ( 2 ) não ( 3 ) não avaliado (col I)

- satelite: ( ) sim ( ) não (3) não avaliado (col J)

- metástase : (1) em transito (2) local (3) sistêmica (4) não há (col K)

### 3. Histologia da lesão Primária:

- - invasão: ( 1 ) in situ ( 2 ) invasivo (col L)

- fase de crescimento: ( 1 ) vertical ( 2 ) radial ( 3 ) não avaliado (col M)

- Breslow:.....mm (col N)

- índice mitótico:.....10 campos de 400x ( ) não avaliado (col O)

- invasão vascular/linfática: ( 1 ) sim ( 2 ) não ( 3 ) não avaliada (col P)

- invasão perineural: ( 1 ) sim ( 2 ) não ( 3 ) não avaliada (col Q)
- infiltrado inflamatório peritumoral: ( 1 ) sim ( 2 ) não ( 3 ) não avaliada (col R)

4. terapêutica:

- 1ª cirurgia: ( 1 ) na instituição ( 2 ) outra instituição (col S)
- (1) Biópsia incisional (2) Biópsia excisional (3) outros (col T)

- 2ª cirurgia: SOMENTE NA INSTITUIÇÃO (col U)

- Ressecção completa ( 1 )
- Ampliação após excisão prévia ( 2 )
- Ressecção + linfadenectomia (3 )
- Ressecção + linfonodo sentinela ( 4 )
- Outros (5)
- Não realizada (6) .
- Linfonodo sentinela (col V)
- ( 1 ) positivo ( 2 ) negativo (3) não realizado

Linfadenectomia: (col W)

- ( 1 ) nódulos clinicamente positivos ( 2 ) LNS positivo (3) não realizada

6. Super-expressão dos marcadores:

- Ki 67: ( ) sim ( ) não (col X)
- Bcl-2: ( ) sim ( ) não (col Y)
- P53: ( ) sim ( ) não (col Z)

7. Evolução: (col AA)

- (1) vivo sem doença (2) vivo com doença local (3) vivo com doença sistêmica
- (4) óbito .

Recidiva ( col AB)

- (1) Local (2) sistêmica (3) não houve

Sobrevida \_\_\_\_ meses (col AC )

tempo de intervalo livre de doença:.....meses (col AD) OI AE - \*\*\* são prontuários revisados

### Análise descritiva das variáveis

	N	Minimum	Maximum	Média	Desv. Pad.
idade	41	23,0	82,0	53,85	15,396
tamanho (cm)	41	1,0	14,0	3,23	2,448
Sobrevida Global (mes)	41	0,0	86,0	32,83	22,740
Sobrevida Livre de Doença (mes)	41	0,0	86,0	31,83	22,780

		Freq.	%
sexo	Masc	23	56,1
	Fem	18	43,9
	Total	41	100,0

		Freq.	%
tipo	Superficial	16	39,0
	Nodular	17	41,5
	Acral	5	12,2
	Outros	3	7,3
	Total	41	100,0

		Freq.	%
localização	Ms	7	17,1
	Mi	12	29,3
	Tronco	20	48,8
	C/P	2	4,9
	Total	41	100,0

		Freq.	%
Breslow	<=1	15	36,6
	>1	26	63,4
	Total	41	100,0

		Freq.	%
índice mitótico	<=6	35	85,4
	>6	6	14,6
	Total	41	100,0

	Ki-67	Freq.	%
expressão	<=10%	15	36,6
	>10%	26	63,4
	Total	41	100,0

	Bcl-2	Freq.	%
expressão	Positivo	30	73,2
	Negativo	11	26,8
	Total	41	100,0

	p53	Freq.	%
expressão	Positivo	38	92,7
	Negativo	3	7,3
	Total	41	100,0

### **Analise de Sobrevida, por Kaplan-Meier, segundo p53 x Sobrevida Global**

p53	Freq.	Nº de Eventos	Censura (Não óbito)	
			N	%
Positivo	38	3	35	92,1%
Negativo	3	0	3	100,0%
Total	41	3	38	92,7%

#### **Positivo = 38 casos**

Taxa de sobrevida em 24 meses = 96,0% c/ erro padrão de 3,9%

Taxa de sobrevida em 60 meses = 87,5% c/ erro padrão de 6,8%

#### **Negativo = 3 casos**

Sem ocorrência de óbito, 100% sobrevida.

Teste: **Teste de Log-Rank**

**Hipótese:** Verificar se existe diferença estatística entre as taxas de sobrevida testadas

**Conclusão:** Com base no **valor-p = 0,583**, conclui-se que **não há** evidências estatística de diferença entre as taxas de sobrevida.

### **Analise de Sobrevida, por Kaplan-Meier, segundo Bcl-2 x Sobrevida Global**

Bcl-2	Freq.	Nº de Eventos	Censura (Não óbito)	
			N	%
Positivo	30	2	28	93,3%
Negativo	11	1	10	90,9%
Total	41	3	38	92,7%

#### **Positivo = 30 casos**

Taxa de sobrevida em 24 meses = 95,5% c/ erro padrão de 4,4%

Taxa de sobrevida em 60 meses = 90,4% c/ erro padrão de 6,5%

#### **Negativo = 11 casos**

Taxa de sobrevida em 24 meses = 80,0% c/ erro padrão de 17,9%

Taxa de sobrevida em 60 meses = 80,0% c/ erro padrão de 17,9%

Obs.: No caso do grupo negativo, as taxas não são conclusivas, pois o erro padrão ficou elevado, muito acima do aceitável que é 5%.

Teste: **Teste de Log-Rank**

**Hipótese:** Verificar se existe diferença estatística entre as taxas de sobrevida testadas

**Conclusão:** Com base no **valor-p = 0,649**, conclui-se que **não há** evidências estatística de diferença entre as taxas de sobrevida.

## **Análise de Sobrevida, por Kaplan-Meier, segundo p53 x Sobrevida Livre de Doença**

p53	Freq.	Nº de Eventos	Censura (Não óbito)	
			N	%
Positivo	38	3	35	92,1%
Negativo	3	0	3	100,0%
Total	41	3	38	92,7%

**Positivo = 38 casos**

Taxa de sobrevida em 24 meses = 91,0% c/ erro padrão de 5,0%

Taxa de sobrevida em 60 meses = 91,0% c/ erro padrão de 5,0%

**Negativo = 3 casos**

Não ocorreu óbito neste grupo.

Teste: **Teste de Log-Rank**

**Hipótese:** Verificar se existe diferença estatística entre as taxas de sobrevida testadas

**Conclusão:** Com base no **valor-p = 0,646**, conclui-se que **não há** evidências estatística de diferença entre as taxas de sobrevida.

## **Análise de Sobrevida, por Kaplan-Meier, segundo Bcl-2 x Sobrevida Livre de Doença**

Bcl-2	Freq.	Nº de Eventos	Censura (Não óbito)	
			N	%
Positivo	30	2	28	93,3%
Negativo	11	1	10	90,9%
Total	41	3	38	92,7%

**Positivo = 30 casos**

Taxa de sobrevida em 24 meses = 91,4% c/ erro padrão de 5,8%

Taxa de sobrevida em 60 meses = 91,4% c/ erro padrão de 5,8%

**Negativo = 11 casos**

Taxa de sobrevida em 24 meses = 90,9% c/ erro padrão de 8,7%

Taxa de sobrevida em 60 meses = 90,9% c/ erro padrão de 8,7%

Obs.: No caso do grupo negativo, as taxas não são conclusivas, pois o erro padrão ficou elevado, muito acima do aceitável que é 5%.

Teste: **Teste de Log-Rank**

**Hipótese:** Verificar se existe diferença estatística entre as taxas de sobrevida testadas

**Conclusão:** Com base no **valor-p = 0,852**, conclui-se que **não há** evidências estatística de diferença entre as taxas de sobrevida.

## Analise de Sobrevida, por Kaplan-Meier, segundo Ki-67 x Sobrevida Global

Ki-67	Freq.	Nº de Eventos	Censura (Não óbito)	
			N	%
<=10%	15	0	15	100,0%
>10%	26	3	23	88,5%
Total	41	3	38	92,7%

### <=10%= 15 casos

Não ocorreu óbito neste grupo

### >10%= 26 casos

Taxa de sobrevida em 24 meses = 93,8% c/ erro padrão de 6,1%

Taxa de sobrevida em 60 meses = 79,8% c/ erro padrão de 10,5%

Obs.: No caso do grupo negativo, as taxas não são conclusivas, pois o erro padrão ficou elevado, muito acima do aceitável que é 5%.

Teste: **Teste de Log-Rank**

**Hipótese:** Verificar se existe diferença estatística entre as taxas de sobrevida testadas

**Conclusão:** Com base no **valor-p = 0,118**, conclui-se que **não há** evidencias estatística de diferença entre as taxas de sobrevida.

## Analise de Sobrevida, por Kaplan-Meier, segundo Ki-67 x Sobrevida Livre de Doença

Ki-67	Freq.	Nº de Eventos	Censura (Não óbito)	
			N	%
<=10%	15	0	15	100,0%
>10%	26	3	23	88,5%
Total	41	3	38	92,7%

### <=10%= 15 casos

Não ocorreu obito

### >10%= 26 casos

Taxa de sobrevida em 24 meses = 86,4% c/ erro padrão de 7,4%

Taxa de sobrevida em 60 meses = 86,4% c/ erro padrão de 7,4%

Teste: **Teste de Log-Rank**

**Hipótese:** Verificar se existe diferença estatística entre as taxas de sobrevida testadas

**Conclusão:** Com base no **valor-p = 0,165**, conclui-se que **não há** evidencias estatística de diferença entre as taxas de sobrevida.