

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 15/09/2018.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Juliana Polizel Ocanha

**FOXP3 E IMP3: IMPACTO NA EVOLUÇÃO DOS
DIFERENTES SUBTIPOS CLÍNICOS DE MELANOMA
CUTÂNEO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Professora Dra. Mariângela Esther Alencar Marques

**Botucatu
2016**

Juliana Polizel Ocanha

**FOXP3 E IMP3: IMPACTO NA EVOLUÇÃO DOS DIFERENTES SUBTI-
POS CLÍNICOS DE MELANOMA CUTÂNEO**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Patologia

Orientadora: Mariângela Esther Alencar Marques

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ocanha, Juliana Polizel.

FOX P3 e IMP3 : impacto na evolução dos diferentes
subtipos clínicos de melanoma cutâneo / Juliana Polizel
Ocanha. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Mariângela Esther Alencar Marques
Capes: 40105008

1. Pele - Doenças. 2. Pele - Câncer - Prognóstico.
3. Metástase. 4. Melanoma. 5. Neoplasias. 6. Patologia.

Palavras-chave: Dermatopatologia; Melanoma; Neoplasia
metastática; Prognóstico; Taxas de sobrevida.

Dedicatória

A meus pais, João e Silvia, pelo exemplo de perseverança e honestidade

A meu irmão, Eduardo, pelo aprendizado constante

A meu noivo, José Cândido, pelo companheirismo e carinho

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Dra. Mariângela Esther Alencar Marques,
pela amizade e exemplo de competência profissional

Ao pesquisador Dr. José Cândido Caldeira Xavier Jr. pela análise sempre
criteriosa dos textos e pela paciência.

À Professora Dra. Márcia Guimarães da Silva pelo apoio na obtenção do
auxílio Fapesp, sem o qual este projeto não seria possível.

À secretária Denise Ap. dos Santos pelo levantamento das biópsias junto
ao arquivo da Patologia. À secretária Cristina A. Alquati Dorico pelo apoio
em várias etapas.

Aos técnicos Marcos Roberto Franchi, Celene Maria C. Gandin, Luiz Fer-
nando Franchi, José Carlos Pedroso de Lima, e auxiliar Rita de Cássia de
Moraes pelo apoio e compromisso no preparo e entrega das lâminas.

À Secretária Vânia A. Soler pela atenção e gentileza.

Ao estatístico Hélio R.C. Nunes pela presteza na realização das análises
estatísticas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela viabili-
zação do projeto.

“Eu sou é eu mesmo. Divêrjo de todo mundo... eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa”.

Grande sertão: veredas - Página 16, de João Guimarães Rosa - Publicado por J. Olympio, 1958 - 571 páginas

INTRODUÇÃO: O melanoma apresentou aumento na sua incidência com o passar dos anos. Apesar das melhorias no diagnóstico e tratamento, demonstra mortalidade considerável. A incapacidade de prever com maior precisão sua evolução ainda intriga os pesquisadores. Dois marcadores imuno-histoquímicos, FOXP3 e IMP3 vêm sendo relacionados a pior prognóstico em vários estudos. **OBJETIVO:** Avaliar se a presença de FOXP3 e IMP3 é diferente entre os subtipos clínicos e se há correlação entre a sua presença e pior prognóstico. **MÉTODOS:** Estudo do tipo coorte retrospectiva, que avaliou todos os pacientes diagnosticados com Melanoma a partir do exame anatomopatológico no período de 2003 a 2011 provenientes dos serviços de Dermatologia e Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP). As lâminas foram reanalisadas por dois patologistas e uma dermatologista, para assegurar subtipo clínico, Breslow, presença de ulceração, mitoses e regressão histológica. A partir dos blocos mantidos em arquivo se realizou a técnica imuno-histoquímica dos marcadores FOXP3 e IMP3. Além disso, foi realizado estudo de prontuário para avaliar aspectos demográficos, clínicos e de evolução do paciente. Foram aplicados os testes Qui-Quadrado ou Exato de Fisher, Kruskal Wallis, Teste de Dunn e Modelo de Regressão de Cox. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$. **RESULTADOS:** A maioria de casos

teve positividade \leq a 25% tanto para IMP3 como para FOXP3. A positividade deles não pôde ser correlacionada à presença de metástases ($p= 0,947$ e $p=0,936$, respectivamente). O subtipo nodular foi o subtipo que mais teve associação com metástase (RR = 9), mas todos os subtipos tiveram maior risco em relação ao extensivo superficial. Breslow, ulceração e mitose foram associados a metástase (RR= 8,33; 5,44 e 13,44 respectivamente, $p<0,001$). Regressão foi inversamente relacionada à ocorrência de metástases (RR =0,36, $p=0,021$). CONCLUSÃO: Não há evidência de benefício do uso de IMP3 ou FOXP3 como marcadores prognósticos em melanoma primários na nossa população.

BACKGROUND: Melanoma keeps growing up in incidence over the years. Despite of the improvements in diagnosis and treatment, it still has considerable mortality. The incapability to predict with more precision its evolution continues to urge specialists. Two immunohistochemistry markers, FOXP3 and IMP3 have been related to worse prognosis in several studies. **OBJECTIVE:** To evaluate if the presence of FOXP3 and IMP3 is different among clinical subtypes and if there is correlation between their presence and worse prognosis. **METHODS:** Retrospective cohort study that analyzed all patients diagnosed with Melanoma by anatomopathological species in the period of 2003 to 2011, from Dermatology and Pathology services of Botucatu Medical School (UNESP). The samples were reanalyzed by two pathologists and one dermatologist to ensure clinical subtype, Breslow, presence of ulceration, mitosis and histological regression. From the species maintained in archives, the FOXP3 and IMP3 immunohistochemistry techniques were performed. Besides that, a records study was executed in order to evaluate demographic, clinical and evolution aspects of the patients. It was applied Qui-square, Fisher's Exact test, Kruskal Wallis' test, Dunn's Test and Cox Regression analysis. It was considered statistically significant p value <0,05. **RESULTS:** The majority of cases had positivity of 25% or less for IMP3 and FOXP3. Their positivity

could not be related to the presence of metastasis ($p= 0,947$ and $p=0,936$, respectively). Nodular subtype was the one which had higher association with metastasis (OR = 9), but all subtypes had higher risk compared to superficial spreading. Breslow, ulceration and mitosis were associated to metastasis (OR= 8,33; 5,44 and 13,44 respectively, $p=$ or $<0,001$). Regression was inversely associated to occurrence of metastasis (OR =0,36, $p=0,021$). CONCLUSION: There was no evidence of the benefit of using IMP3 or FOXP3 as prognosis markers in primary melanomas in our population.

Lista de Abreviaturas

Ac = Acral Lentiginoso

BRAF = protooncogene que produz proteína B-Raf

cm = centímetros

CTLA4 = Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico

ES = extensivo superficial

FOXP3 = fator de transcrição "Forkhead"

HE = Hematoxilina e Eosina

IMP3 = proteína ligante tipo 3 do RNA mensageiro do fator de crescimento relacionado à Insulina do tipo 2

INCA = Instituto Nacional do Câncer

LM = Lentigo maligno

mm = milímetros

Nd = nodular

PDL1 = Ligante de morte programada tipo 1

Treg = Células T reguladoras

UNESP = Universidade Estadual Paulista

Sumário

Folha de rosto	2
Dedicatória	5
Agradecimentos	6
Resumo	8
Abstract	10
Lista de abreviaturas	12
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	15
1. Introdução	16
2. Referências bibliográficas	27
CAPITULO II – OBJETIVOS	39
3. Objetivos	40
CAPITULO III - MATERIAIS E MÉTODOS	42
4. Materiais e Métodos	43
4.1. Descrição da amostra e tipo de estudo	43
4.2. Seleção dos sujeitos	43
4.2.1. Critérios de Inclusão	43
4.2.2. Critérios de Exclusão	44
4.3.1. Variáveis Clínicas	45
4.3.2. Variáveis Histopatológicas	45
4.4. Coleta dos dados	45
4.5. Processamento dos dados	46
4.5.1. Avaliação de prontuário	46
4.5.2. Critérios histopatológicos	46
4.5.3. Técnica imuno-histoquímica	47
4.5.4. Análise imuno-histoquímica	48
4.6. Análise estatística	52
4.7. Aspectos éticos	52
4.8. Aspectos financeiros	52
CAPITULO IV – ARTIGOS CIENTÍFICOS	53
Artigo 1.	55
Artigo 2.	71

Sumário

CAPÍTULO V – CONCLUSÃO	90
5. Conclusão	91
ANEXOS	92
Anexo 1	93
Anexo 2	94
Anexo 3	95
Anexo 4	96

CAPÍTULO I – Revisão da Literatura

1. Introdução

O melanoma cutâneo é um câncer decorrente da proliferação anormal de melanócitos na epiderme. Comparativamente a outros tumores de pele, como carcinoma basocelular e espinocelular, é menos frequente, porém assume importância pela sua mortalidade. No Brasil a estimativa é de 5670 casos novos em 2016, enquanto que para os cânceres de pele não melanoma a estimativa é de 175760 novos casos em 2016.¹

Nos Estados Unidos, houve aumento em sua frequência de 15/100000 para 21.6/100000 no período de 1992 a 2014, o que representa um aumento por volta de 1.4% ao ano. O número de mortes é próximo de 2.7/100000 ao ano, o que representa 1.7% de todas as mortes por câncer. Houve melhora da sobrevida geral no mesmo período, de cerca de 90% para 93,3%.²

Quando é confinado à epiderme (“in situ”) a sobrevida em 5 anos é próxima de 98.3%, mas quando metastático a taxa de sobrevida em 5 anos fica abaixo de 18%. Dessa forma, por ser uma lesão potencialmente curável nas fases iniciais, tem importância o diagnóstico precoce.²

Desde 1969, o melanoma foi subdividido em subtipos, clínicos e histopatológicos, sendo os 4 principais: Extensivo Superficial, Lentigo Maligno, Lentiginoso Acral e Nodular.³ Depois que o estadiamento do *American Joint Cancer Committee*⁴ incorporou Breslow, taxa mitótica e ulceração

como principais marcadores de pior prognóstico, a importância do subtipo histológico foi reduzida. Mas a descoberta de mutações gênicas preferenciais em subtipos clínicos, como a presença de NRAS ser mais comum nos melanomas acrais, e BRAF mais comum nos extensivos superficiais,^{5,6,7} reforçou a observação clínica de uma evolução natural distinta entre os grupos.

O mais frequente é o subtipo Extensivo Superficial, que se caracteriza por lesão na maioria das vezes, plana, acastanhada, que acomete predominantemente homens no dorso e mulheres, nos membros inferiores.^{8,9} Na análise histopatológica observa-se proliferação melanocítica atípica com tendência a crescimento inicialmente radial e posteriormente vertical. Corresponde de 30 a 70% dos melanomas, variando conforme a população étnica estudada.^{10,11} Este subtipo apresenta mecanismo fisiopatológico melhor compreendido dentre os subtipos.^{7,12}

O melanoma nodular, por sua vez, apresenta crescimento vertical rápido, e não exhibe fase de crescimento radial, o que acarreta em um prognóstico geralmente pior.^{13,14} Por causa da sua apresentação clínica é frequentemente uma lesão autodiagnosticada,¹⁵ já que se revela como pápula de surgimento abrupto e, muitas vezes, friável. Baumert et al.¹⁶ mostraram, entretanto, que não houve correlação entre a espessura tumoral nos subtipos acral e nodular e maior conhecimento sobre o melanoma, nova-

mente sugerindo uma agressividade biológica maior nestes subtipos, e contradizendo a teoria de que são agressivos por serem diagnosticados tardiamente.

O subtipo lentigo maligno se caracteriza por lesão geralmente mal delimitada em áreas fotoexpostas de pessoas idosas, com crescimento mais indolente.^{17,18} Houve um estudo¹⁹ que demonstrou que, caso não houvesse abordagem da lesão inicial, um paciente de 45 anos diagnosticado com Lentigo maligno (lesão *in situ*) teria a chance de 3,3% de desenvolver melanoma aos 75 anos e um paciente de 65 anos teria chance de 1,2% de desenvolver melanoma aos 75 anos. Levando em conta a idade do paciente, comorbidades e, além disso, a dificuldade cirúrgica em muitos casos, pois as margens cirúrgicas são clinicamente difíceis de delimitar, acarretando em múltiplas abordagens, houve uma tendência de realizar terapias mais conservadoras. Entretanto é um tumor com relatos não tão infrequentes de metástases, principalmente linfonodais,^{20,21} a despeito de seu crescimento lento.

Por fim, o subtipo lentiginoso acral é o subtipo mais frequente em indivíduos da etnia negra e amarela.^{22,23,24} Tem apresentação mais comum em idosos, no hálux, e pode se apresentar em região subungueal através de faixa enegrecida. Geralmente apresenta diagnóstico mais tardio.^{24,25,26} A literatura é controversa ao discutir se os melanomas acrais são biologicamente agressivos ou eles são diagnosticados tardiamente, em estágios já

avançados. Porém alguns estudos sugerem que este subtipo e o nodular têm sobrevida menor e prognóstico pior em relação aos outros subtipos.^{27,28,29}

A incapacidade de prevermos completamente a propensão de um melanoma a desenvolver metástases é a principal barreira para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes para a doença.³⁰ Apesar das tentativas de melhora no seguimento e tratamento dos pacientes, existem casos que fogem à regra: melanomas pouco espessos desenvolvendo metástases agressivas e lesões espessas com longa sobrevida livre de doença.³⁰

A procura dos serviços de saúde mais precoce dos pacientes e novas tecnologias como a dermatoscopia, a microscopia confocal e o mapeamento digital das lesões melanocíticas têm aprimorado o diagnóstico. Estes métodos vêm aumentando o número de lesões suspeitas excisadas em fases iniciais, o que é verificado pelo aumento da incidência e estabilização da mortalidade da doença.^{2,31}

A patologia permanece o padrão ouro para diagnóstico. O melanoma em suas fases iniciais é responsável por dúvidas diagnósticas entre especialistas. Para estas lesões não existe, até o momento, técnica ou marcador imuno-histoquímico ou molecular definitivo para o diagnóstico.³²

Um estudo realizado no Massachusetts General Hospital³³ demonstrou as diferenças de uma segunda avaliação do patologista especialista em relação à primeira avaliação pelo patologista generalista, e o impacto desta nova avaliação em relação a mudanças em diagnóstico e tratamento. Cerca de 35% das lesões melanocíticas tiveram seu diagnóstico alterado de benigno para maligno e vice-versa após a segunda avaliação. Em cerca de 13% dos casos isso implicou em mudanças em relação a terapêutica. Outro estudo sueco demonstrou mudança de classificação de lesões < 1mm ou *in situ* para >1 mm em 15,5% dos casos, quando comparada a avaliação de um patologista generalista para um especialista.³⁴ Isso mostra quão difícil e desafiador pode ser o estudo das lesões melanocíticas.

Para diminuir a discordância entre os especialistas, vários escores foram criados com o objetivo de aumentar a reprodutibilidade do diagnóstico.^{32,35} Entretanto, a aplicação dos escores não elimina totalmente a chamada zona cinzenta, na qual, um pequeno número de lesões se situa. Nestas lesões o diagnóstico de malignidade ou benignidade se torna complexo.

Vários marcadores imuno-histoquímicos têm sido utilizados neste sentido, para auxiliar no diagnóstico do melanoma, dentre eles S-100 (proteína S-100), Melan A (MART-1) e HMB 45. O S-100 é um marcador para diferenciação neural e melanocítica. O Melan A é mais específico para

melanócitos, porém tem sensibilidade menor. Já o marcador HMB 45 é marcador de melanócitos intraepidérmicos, imaturos e ativados,³⁶ podendo através de sua intensidade de imunocoloração indicar grau de maturação das células melanocíticas.

Melan A, S-100 e HMB 45 não são específicos, sendo a co-positividade dos 3 marcadores identificada em apenas 49,7% dos melanomas.³⁷ Ainda neste estudo,³⁷ foram avaliados 121 melanomas primários e 201 melanomas metastáticos, e se avaliou a correlação entre positividade da coloração (quando se observou positiva em mais de 25% do tumor), fatores clinicopatológicos e prognóstico. O S-100 foi o marcador mais sensível, com sensibilidade próxima de 91%, concordando com a literatura, enquanto melan A foi positivo em 73% dos tumores e HMB-45 em 63%. É importante notar que o melan A teve especificidade de 95%, superior ao S-100, cuja especificidade varia de 75 a 87%. Não houve correlação entre positividade dos três marcadores e sobrevida, quando corrigidos para idade e Breslow. Porém, houve correlação entre negatividade para HMB 45 e microsatelitose, bem como menor positividade de HMB 45 em tumores que já sofreram metástase.

Shah et al.³⁸ já haviam mostrado menor positividade de HMB 45 em tumores metastáticos e demonstrou sua positividade também em lesões benignas como nevos juncionais, maior do que para nevos intradérmicos.

Ou seja, trata-se de marcador que pode estar positivo tanto em lesões benignas quanto malignas, uma vez que estes melanócitos estejam ativados.

Recentemente, foi descrito um marcador imuno-histoquímico denominado IMP3 (*Insulin-like growth factor-II messenger RNA (mRNA)-binding protein-3* ou Proteína ligante tipo 3 do RNA mensageiro do fator de crescimento relacionado à insulina tipo 2). Participa da modulação fina pós transcricional de oncogenes relacionados à proliferação celular, metástases, resistência a quimioterapia e sobrevida.³⁹ É expresso por tecidos embrionários e algumas neoplasias. Nos melanócitos, se demonstra por imunocoloração no citoplasma. Há poucos estudos do uso de IMP3 para melanoma, sendo que neles foi considerada positiva a marcação se presente em mais que 10% dos melanócitos por observação direta.^{40,41}

Foi demonstrada negatividade de IMP3 para nevos comuns e displásicos, positividade fraca em melanomas finos e nevos de Spitz, e forte positividade em melanomas metastáticos.⁴² Houve positividade em 90% dos melanomas metastáticos, 63% dos melanomas malignos e em 20% dos nevos, correspondendo apenas a nevos de Spitz, em outro estudo.⁴⁰

Também se demonstrou maior positividade de IMP3 em tumores avançados e metastáticos, indicando provável pior prognóstico nos melanomas IMP3 positivos.⁴¹ Este artigo propõe, inclusive, um mecanismo para esta atuação, aumentando a migração e invasão das células do melanoma.

Já houve sugestão de seu uso para discriminar nevos benignos intranodais de metástases linfonodais de melanoma.⁴³

Entretanto Chokoeva et al.⁴⁴ demonstrou positividade em apenas 40% dos melanomas e 20% dos nevos displásicos, e não considerou o marcador como bom discriminador de malignidade e benignidade assim como teria baixa correlação com prognóstico.

Outro assunto de interesse em relação aos melanomas é a resposta imune do hospedeiro. Foi demonstrado que o melanoma apresenta vários mecanismos de “fuga” da resposta imune. Um destes mecanismos de fuga seria a expressão de um fator de transcrição pelas suas células, o FOXP3 (*Forkhead transcription fator*), e também é expresso nas células T reguladoras, (CD4+CD25^{high}). As células T reguladoras atuam inibindo diretamente as células T efectoras, CD8⁺, lançando citocinas inibitórias, competindo com elas pela ligação com as células apresentadoras de antígeno, levando à apoptose e diminuição da proliferação das células TCD8⁺, principais responsáveis pela defesa do hospedeiro em relação ao tumor.^{45,46}

O FOXP3 se caracteriza, portanto, por ser marcador nuclear de linfócitos CD4+CD25^{high}. Vários métodos foram utilizados para demonstrar sua positividade, sem padronização definida. Alguns artigos relatam contagem manual total das células coradas e a partir da mediana das contagens, classificaram-se os valores acima da mediana como “alta concentração” e

os abaixo da mediana como “baixa concentração”,⁴⁷ outros analisaram *hot spots*, ou seja, áreas com notável concentração de linfócitos, com contagem manual das células positivas nestes locais,⁴⁸ e por fim outros realizaram avaliação da porcentagem de células positivas e avaliaram intensidade da coloração, como forte, moderada e fraca.⁴⁵

Numerosos estudos em animais demonstram correlação positiva entre presença de Tregs e progressão do tumor. Foi demonstrado em células de melanoma de murinos que a inibição de FOXP3 levou ao atraso no tempo de aparecimento de lesão visível, diminuiu o peso do tumor e aumentou o tempo de sobrevivência.⁴⁹ A presença de células FOXP3 positivas foi associada à progressão mais rápida do tumor e maior número de metástases para linfonodo sentinela.⁴⁷ Foi observado também que a inibição do FOXP3 aumenta a eficácia da vacinação tumoral com base celular.⁵⁰ No entanto, há discordância na literatura sobre essa associação entre presença de FOXP3 em melanomas com sobrevivência, pois outros estudos não a demonstraram.^{48,51}

Com relação às terapias imunológicas contra o melanoma metastático, como o anti CTL4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) Ipilimumabe, demonstrou-se ação de depleção sobre células CD4/FOXP3 positivas^{52,53} e também a presença de células FOXP3 pré-tratamento corre-

lacionou-se a melhor resposta à droga.⁵⁴ Outro estudo sugere que a presença de células FOXP3+ pré-tratamento também tenha correlação com resposta terapêutica nos agentes anti-PDL1 (*Programmed death-ligand 1*), como exemplo Nivolumabe⁵⁵ e inibidores da mutação BRAF (*protooncogene que produz a proteína B-Raf*), como exemplo Vemurafenib.⁵⁶

Existe outro fenômeno que ocorre no melanoma, denominado “regressão histológica”, em que há substituição da lesão melanocítica por área de intenso infiltrado inflamatório associado à fibrose e neoformação vascular. Há discussão na literatura sobre se a regressão seria uma marcadora de invasão do tumor, que por este motivo teria desencadeado resposta inflamatória, ou marcador da resposta imune do hospedeiro.^{57,58}

Socrier⁵⁹ e Munsch et al.⁶⁰ não encontraram relação positiva entre regressão e metástases ao linfonodo sentinela nos melanomas finos. Pacientes com melanomas sucessivos não apresentaram regressão histológica na lesão inicial, mas desenvolveram nas lesões subsequentes, que apresentaram melhor classificação histológica que a lesão inicial.^{61,62} Recentemente, foi realizada metanálise com 10098 pacientes⁶³ que demonstrou que o risco de metástase para linfonodo sentinela é significativamente menor nos pacientes com regressão histológica. Seria interessante, portanto, observar a presença de FOXP3 nos linfócitos da regressão histológica e correlacioná-la com prognóstico.

Por fim, a proposta deste trabalho é avaliar a expressão dos dois marcadores imuno-histoquímicos: IMP3, marcador que caracterizaria malignidade e FOXP3, que avalia a resposta imune do hospedeiro e a secreção tumoral deste fator de transcrição. Esta avaliação de suas distribuições nos subtipos de melanoma e sua correlação com predição prognóstica é inédita. O método é pouco oneroso e de fácil realização, e possibilitaria melhor caracterização da lesão primária quanto a prognóstico; aperfeiçoando, desta forma, o diagnóstico e seguimento dos pacientes.

2. Referências Bibliográficas

- 1) Instituto Nacional do Câncer [Internet]. Brasil: Portal do Instituto Nacional do Câncer [updated in 2016; cited in 2016 Mai 28. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>
- 2) Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Rusakiewicz S, Chaput N, Altekruse SF et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/. Accessed 04 Jul 2016.
- 3) de Vries E, Bray F, Coebergh JW, Cerroni L, Ruiter DJ, Elder DE, et al. Melanocytic tumours. In: LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A, editors. Skin tumours. Lyon: IARC Press; 2006. p. 49-120.
- 4) Balch CM, Gershenwald JE, Soong S, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR et al. Final version of 2009 AJCC Melanoma staging and classification. J Clin Oncol. 2009; 27:6199-6206.
- 5) Mazurenko NN, Tsyganova IV, Lushnikova AA, Ponkratova DA, Anurova OA, Cheremushkin EA et al. Spectrum of oncogene mutations is different in melanoma subtypes. Mol Biol (Mosk). 2015; 49:1022-1029.

6) Slipicevic A, Herlyn M. KIT in melanoma: many shades of gray. *J Invest Dermatol.* 2015; 135:337-338.

7) Greenwald HS, Friedman EB, Osman I. Superficial Spreading and Nodular Melanoma are distinct biological entities: a challenge to the linear progression model. *Melanoma Res* 2012; 22: 1-8.

8) Singh P, Kim HJ, Schwartz RA. Superficial spreading melanoma: an analysis of 97 702 cases using the SEER database. *Melanoma Res.* 2016; 26:395-400.

9) De Lima AS, Stein CE, Casemiro KP, Rovere RK. Epidemiology of Melanoma in the South of Brazil: study of a city in the Vale do Itajaí from 1999 to 2013. *An Bras Dermatol.* 2015; 90:185-189.

10) Garnett E, Townsend J, Steele B, Watson M. Characteristics, rates, and trends of melanoma incidence among Hispanics in the USA. *Cancer Causes Control.* 2016; 27:647-659.

11) Haenssle HA, Hoffmann S, Buhl T, Emmert S, Schön MP, Bertsch HP et al. Assessment of melanoma histotypes and associated patient related factors: basis for a predictive statistical model. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015; 13:37-45.

12) Elder DE. Melanoma progression. *Pathology.* 2016; 48:147-154.

13)Demierre MF, Chung C, Miller DR, Geller AC. Early detection of thick melanomas in the United States: beware of the nodular subtype. *Arch Dermatol.* 2005; 141:745-750.

14)Betti R, Martino P, Vergani R, Gualandri L, Crosti C. Nodular melanomas: analysis of the casuistic and relationship with thick melanomas and diagnostic delay. *J Dermatol.* 2008; 35:643-650.

15)Moreau JF, Weinstock MA, Geller AC, Winger DG, Ferris LK. Individual and ecological factors associated with early detection of nodular melanoma in the United States. *Melanoma Res.* 2014; 24:165-171.

16)Baumert J, Plewig G, Volkenandt M, Schmid-Wendtner MH. Factors associated with a high tumour thickness in patients with melanoma. *Br J Dermatol.* 2007; 156:938-944.

17)Tannous ZS, Lerner LH, Duncan LM, Mihm MC Jr, Flotte PJ. Progression to invasive melanoma from malignant melanoma in situ, lentigo maligna type. *Hum Pathol.* 2000; 31:705-708.

18)Kasprzak JM, Xu YG. Diagnosis and management of lentigo maligna: a review. *Drugs Context.* 2015; 4:212281.

19)Weinstock MA, Sober AJ. The risk of progression of lentigo maligna to lentigo maligna melanoma. *Br J Dermatol.* 1987; 116:303-310.

20)Ettl T, Irga S, Müller S, Rohrmeier C, Reichert TE, Schreml S et al. Value of anatomic site, histology and clinicopathological parameters for prediction of lymph node metastasis and overall survival in head and neck melanomas. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014; 42:252-258.

21)Schoenewolf NL, Belloni B, Simcock M, Tonolla S, Vogt P, Scherrer E et al. Clinical implications of distinct metastasizing preferences of different melanoma subtypes. *Eur J Dermatol.* 2014; 24:236-241.

22)Madankumar R, Gumaste PV, Martires K, Schaffer PR, Choudhary , Falto-Aizpurua L et al. Acral melanocytic lesions in the United States: Prevalence, awareness, and dermoscopic patterns in skin-of-color and non-Hispanic white patients. *J Am Acad Dermatol.* 2016; 74:724-730.

23)Goydos JS, Shoen SL. Acral Lentiginous Melanoma. *Cancer Treat Res.* 2016; 167:321-329.

24) Kim JY, Choi M, Jo SJ, Min HS, Cho KH. Acral lentiginous melanoma: indolent subtype with long radial growth phase. *Am J Dermatopathol.* 2014; 36:142-147.

25) Bello DM, Chou JF, Panageas KS, Brady MS, Coit DG, Carvajal RD et al. Prognosis of acral melanoma: a series of 281 patients. *Ann Surg Oncol.* 2013; 20:3618-3625.

26) Lin MJ, Mar V, McLean C, Wolfe R, Kelly JW. Diagnostic accuracy of malignant melanoma according to subtype. *Australas J Dermatol.* 2013; 55:35-42.

27) Kabbarah O, Nogueira C, Feng B, Nazarian RM, Bosenberg M, Wu M et al. Integrative genome comparison of primary and metastatic melanomas. *PLoS One.* 2010; 24:e10770.

28) Boriani F, O'Leary F, Tohill M, Orlando A. Acral Lentiginous Melanoma - misdiagnosis, referral delay and 5 years specific survival according to site. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014; 18:1990-1996.

29) Marek AJ, Ming ME, Bartlett EK, Karakousis GC, Chu EY. Acral Lentiginous Histologic Subtype and Sentinel Lymph Node Positivity in Thin Melanoma. *JAMA Dermatol.* 2016; 152(7):836-837.

30)Albreski D, Sloan SB. Melanoma of the feet: misdiagnosed and misunderstood. *Clin Dermatol.* 2009; 27:556-563.

31)Lanoy E. Epidemiology, risk factor and screening for melanoma and other skin cancers. *Rev Prat.* 2014; 64:31-36.

32)Veronese LA, Corrente JE, Marques MEA. Melanoma maligno cutâneo: sistema de pontos (scoring system) para auxílio no diagnóstico histopatológico. *J Bras Patol Med Lab* 2006; 42:369-377.

33)Hawryluk EB, Sober AJ, Piris A, Nazarian RM, Hoang MP, Tsao H et al. Histologically challenging melanocytic tumors referred to a tertiary care pigmented lesion clinic. *J Am Acad Dermatol.* 2012; 67:727-735.

34)Eriksson H, Frohm-Nilsson M, Hedblad MA, Hellborg H, Kanter-Lewensohn L, Krawiec K et al. Interobserver variability of histopathological prognostic parameters in cutaneous malignant melanoma: impact on patient management. *Acta Derm Venereol.* 2013; 93:411-416.

35)Babacan A, Lebe B. Grade of atypia in dysplastic nevi and relationship with dermal fibroplasia. *Turk Patoloji Derg.* 2012; 28:17-23.

36)Nielsen PS, Riber-Hansen R, Steiniche T. Immuno-histochemical double stains against Ki67/MART1 and HMB45/MITF: promising diagnostic tools in melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol.* 2011; 33:361–370.

37)Viray H, Bradley WR, Schalper KA, Rimm DL, Rothberg BG. Marginal and Joint Distributions of S100, HMB-45, and Melan-A Across a Large Series of Cutaneous Melanomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2013; 137:1063–1073.

38)Shah IA, Gani OS, Wheler L. Comparative immunoreactivity of CD-68 and HMB-45 in malignant melanoma, neural tumors and nevi. *Pathol Res Pract.* 1997; 193:497-502.

39)Lederer M, Bley N, Schleifer C, Hüttelmaier S. The role of the oncofetal IGF2 mRNA-binding protein 3 (IGF2BP3) in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2014; 29:3-12.

40)Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA, Xu H. IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Modern Pathol.* 2008; 21:431-437.

41)Sheen YA, Liao YH, Lin MH, Chu CY, Ho BY, Hsieh MC et al. IMP-3 promotes migration and invasion of Melanoma cells by modulating the expression of HMGA2 and predicts poor prognosis in Melanoma. *J Invest Dermatol.* 2015; 135:1065–1073.

42) Yu L, Xu H, Wasco MJ, Bourne PA, Ma L. IMP-3 expression in melanocytic lesions. *J Cutan Pathol*. 2010; 37:316-322.

43) Mentrikoski MJ, Ma L, Pryor JG, McMahon LA, Yang Q, Spaulding BO et al. Diagnostic utility of IMP3 in segregating metastatic melanoma from benign nevi in lymph nodes. *Mod Pathol*. 2009; 22:1582-1587.

44) Chokoeva AA, Ananiev J, Wollina U, Tana C, Lotti T, Cardoso JC et al. IMP-3 expression in benign melanocytic nevi, dysplastic nevi and malignant melanoma: Preliminary findings in Bulgarian patients. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2015; 29:695-699.

45) Niu J, Jiang C, Li C, Liu L, Li K, Gao T. Foxp3 expression in melanoma cells as a possible mechanism of resistance to immune destruction. *Cancer Immunol Immunother*. 2011; 60:1109–1118.

46) Ustun C, Miller JS, Munn DH, Weisdorf DJ, Blazar BR. Regulatory T cells in acute myelogenous leukemia: is it time for immunomodulation? *Blood*. 2011; 118:5084-095.

47) Gerber LA, Müntz A, Schlapbach C, Shafiqi M, Kiermeir D, Hüsler R et al. High expression of FOXP3 in primary melanoma is associated with tumour progression. *Br J Dermatol.* 2014; 170:103-109.

48) Ladányi A, Mohos A, Somlai B, Liskay G, Gilde K, Fekes Z et al. FOXP3+ cell density in primary tumor has no prognostic impact in patients with cutaneous malignant melanoma. *Pathol Oncol Res.* 2010; 16:303-309.

49) Franco-Molina MA, Miranda-Hernández DF, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Coronado-Cerda EE, Sierra-Rivera CA et al. Silencing of Foxp3 delays the growth of murine melanomas and modifies the tumor immunosuppressive environment. *Onco Targets Ther.* 2016; 9:243-253.

50) Klages K, Mayer CT, Lahl K, Loddenkemper C, Teng MW, Ngiow SF et al. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma. *Cancer Res.* 2010; 70:7788-7799.

51) Hillen F, Baeten CI, van de Winkel A, Creyten D, van der Schaft DW, Winnepenninckx V et al. Leukocyte infiltration and tumor cell plasticity are parameters of aggressiveness in primary cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2008; 57:97-106.

52) Bjoern J, Juul Nitschke N, Zeeberg Iversen T, Schmidt H, Fode K, Svane IM. Immunological correlates of treatment and response in stage IV malignant melanoma patients treated with Ipilimumab. *Oncoimmunology*. 2015;5:e1100788.

53) Hannani D, Vétizou M, Enot D, Rusakiewicz S, Chaput N, Klatzmann D et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade: obligatory contribution of IL-2 receptors and negative prognostic impact of soluble CD25. *Cell Research*. 2015; 25:208-224.

54) Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Foppen MG, Yuan J, Postow MA, Wong P et al. Baseline Peripheral Blood Biomarkers Associated with Clinical Outcome of Advanced Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Clin Cancer Res*. 2016; 22:2908-2918.

55) Feng Z, Puri S, Moudgil T, Wood W, Hoyt CC, Wang C et al. Multispectral imaging of formalin-fixed tissue predicts ability to generate tumor-infiltrating lymphocytes from melanoma. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2015; 3:47.

56) Steinberg SM, Zhang P, Malik BT, Boni A, Shabaneh TB, Byrne KT et al. BRAF inhibition alleviates immune suppression in murine autochthonous melanoma. *Cancer Immunol Res*. 2014; 2:1044-1050.

57)Zurac S, Negroiu G, Petrescu S, Andrei R, Tebeica T, Popp C et al. Spectrum of morphologic alterations of regression in cutaneous melanoma--potential for improving disease prognosis. Rom J Intern Med. 2012; 50:145-153.

58)Garbe C. Partial Histological Tumor Regression in Primary Melanoma as Protective Factor for Lymph Node Micrometastasis. JAMA Dermatol. 2015; 151:1291-1292.

59)Socrier Y, Lauwers-Cances V, Lamant L, Garrido I, Lauwers F, Lopez R et al. Histological regression in primary melanoma: not a predictor of sentinel lymph node metastasis in a cohort of 397 patients. Br J Dermatol. 2010; 162:830-834.

60)Munsch C, Lauwers-Cances V, Lamant L, Gentil C, Rochaix P, Garrido I et al. Breslow thickness, clark index and ulceration are associated with sentinel lymph node metastasis in melanoma patients: a cohort analysis of 612 patients. Dermatology. 2014; 229:183-189.

61)Martín JM, Pinazo I, Mateo JF, Escandell I, Jordá E, Monteagudo C. Assessment of regression in successive primary melanomas. Actas Dermosifiliogr. 2014; 105:768-773.

62)Vecchiato A, Pasquali S, Menin C, Montesco MC, Alai-
bac M, Mocellin S et al. Histopathological characteristics of subse-
quent melanomas in patients with multiple primary melanomas. *J Eur
Acad Dermatol Venereol.* 2014; 28:58-64.

63)Riberio S, Gualano MR, Osella-Abate S, Scaioli G, Bert
F, Sanlorenzo M et al. Association of Histologic Regression in Pri-
mary Melanoma With Sentinel Lymph Node Status: A Systematic Re-
view and Meta-analysis. *JAMA Dermatol.* 2015; 151:1301-1307.