



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE
MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU



**ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA DE MOLÉCULAS DE ADESÃO
CELULAR EM MELANOMAS CUTÂNEOS.**

Mariana Fernandes

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Patologia

BOTUCATU – SP

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE
MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU



**ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA DE MOLÉCULAS DE ADESÃO
CELULAR EM MELANOMAS CUTÂNEOS.**

Mariana Fernandes

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Patologia

Orientador: Dr. Gilles Landman

BOTUCATU – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *SULAMITA SELMA CLEMENTE COLNAGO*

Fernandes, Mariana.

Análise da expressão protéica de moléculas de adesão celular em melanomas cutâneos / Mariana Fernandes. – Botucatu: [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Gilles Landman

Capes: 40105008

1. Melanoma. 2. Colágeno. 3. Pele – Câncer. 4. Laminina.

Palavras-chave: Colágeno IV; Colágeno XVII; Imunoistoquímica; Laminina; Melanoma; Perlecan.

*“As pessoas estão sempre a culpar as circunstâncias
por aquilo que se tornam.
Não acredito em circunstâncias.
As pessoas que estão mais adiantadas neste mundo
são as pessoas que se levantam
e procuram as circunstâncias que desejam,
e se não as encontram, criam-nas.”*

(George Bernard Shaw)

DEDICATÓRIA

À *Deus* por tornar possível a realização dos meus sonhos.

A duas pessoas que tenho o prazer de chamar de pai e mãe, *Odair e Claudia*, que de maneira exemplar me deram a base para me tornar a pessoa que sou. Nunca mediram esforços para minhas realizações e sempre me ensinaram o verdadeiro valor do respeito e humildade. Amo vocês!

A minha irmã *Maira*, que com seu modo especial e excepcional me mostra a cada momento o verdadeiro significado da palavra vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Gilles Landman, pela oportunidade, confiança, paciência, incentivo e aprendizado inesgotável. Pela pessoa e profissional. Na verdade, descobri a exata definição de um 'orientador'... Muito obrigada!

A Prof^a. Dra. Maria Teresa de Seixas Alves, Chefe do Departamento de Patologia, pela possibilidade de executar este estudo no departamento.

A Dra. Edna Sadayo pela confiança, talvez, sem sua ajuda eu não estaria na UNIFESP atualmente!!

Aos meus familiares que de algum modo torcem pelo meu sucesso.

Ao Fernando, por toda ajuda, palavras de apoio e companheirismo nessa jornada...!

Aos docentes, Dra. Celina Oshima, Dr. Daniel Araki, Dra. Silvia Ihara, pelos infinitos aprendizados e confiança. A todos os membros do laboratório de pesquisa do 5º andar pela ótima acolhida, Marcelo, Mirella, Juliana, Ana Paula, Patricia Sakae, Thiago, Patricia e Sandra.

A Larissa, Thais e Viviane por todas as conversas regadas a risadas, conselhos e palavras de carinho.

Aos meus amigos de Botucatu, minha família por escolha, pela lealdade e amizade: comissão ENBM, em especial Vanessa, Grazielle, Patricia, Bianca, Melina, Felipe, Iberê, Vinicius, André e Marcos; Nathália Suiti, Fernanda, Nathália Pereira e Roberta...com vocês passei momentos maravilhosos que deixam saudades.

Aos meus amigos muito especiais Camila e Eliasafe, que mesmo longe se mostraram tão presentes nos meus momentos, seja por pensamento ou por mensagens trocadas. Senti muita falta de vocês...Mas agora é ótimo estar perto novamente.

Aos funcionários do Departamento de Patologia, Lobo, Marissol, Claudio, Sergio, Joaquim e Tânia....por toda assistência.

RESUMO

Introdução: O melanoma cutâneo é uma neoplasia maligna originada pela proliferação desordenada de melanócitos. Tem apresentado um aumento na sua incidência e mortalidade com o passar dos anos. Este tipo de neoplasia pode surgir na pele ou em qualquer outro local em que houve migração das células da crista neural. Os melanócitos localizam-se na camada basal da epiderme formando a unidade pigmentar epidermal, associando um melanócito e 36 queratinócitos. A proliferação dos melanócitos depende desta relação com os queratinócitos, por junções comunicantes, E-caderina e desmogleina. A zona de membrana basal é responsável por promover a integridade da pele, suas estruturas de adesão mostram-se alteradas em diversas doenças cutâneas. Algumas moléculas que desempenham a função de adesão nesta membrana são as lamininas, colágenos tipo IV e tipo XVII e perlecan.

Objetivo: Análise da expressão protéica, de moléculas de adesão celular, em melanomas por estudo imunoistoquímico em arranjo tecidual de matriz (TMA).

Pacientes e Método: Foram selecionados blocos de parafina de pacientes que foram diagnosticados com melanoma cutâneo, no período de 1995 a 2010, chegando a uma casuística de 124 casos. Todos estes passaram por revisão da análise histológica para posterior confecção do arranjo tecidual de matriz (TMA). A expressão protéica será analisada por técnica de imunoistoquímica, usando os marcadores anti-laminina, anti-colágeno tipo IV e tipo XVII e anti-perlecan.

Resultados Parciais: Predominaram os pacientes do sexo feminino, caucasianos e da região Sudeste do Brasil. Houve maior frequência do tipo extensivo superficial ulcerado, com profundidade de Breslow maior que 4 mm, nível de Clark IV e índice mitótico maior que 6 mitoses por campos de grande aumento.

Conclusões: Os pacientes, em sua maioria, eram do sexo feminino com idade média de 57,13 anos e caucasianos. O tipo histológico mais frequente foi o extensivo superficial, seguido do acral lentiginoso. Predominaram casos muito profundos, com espessura de Breslow acima de 4 mm, Clark IV, ulcerados e em média com 9 mitoses por cga (campos de grande aumento), levando ao pior prognóstico desta amostra. Ficou clara a procura tardia destes pacientes pelo serviço médico, sendo demonstrada pelo alto percentual de metástases em linfonodos sentinelas. As metástases viscerais acometeram principalmente pulmões e cérebro. Os pacientes que faleceram devido ao melanoma apresentaram uma sobrevida média de 27,7

meses, comprovando a alta letalidade desta patologia. Sendo que 85,5% apresentaram sobrevida maior que 3 anos.

Palavras-chave: Melanoma; Imunoistoquímica; Colágeno IV; Colágeno XVII; Laminina; Perlecan.

ABSTRACT

Introduction: Cutaneous melanoma is a malignancy caused by the uncontrolled proliferation of melanocytes. Has been increasing in incidence and mortality over the years. This type of tumor may arise in the skin or any other place where there was migration of neural crest cells. Melanocytes are located in the basal layer of the epidermis forming the epidermal melanin unit, involving a melanocyte to 36 keratinocytes. The proliferation of melanocytes depends on this relationship with the keratinocytes, gap junctions, E-cadherin and desmoglein. The basal membrane is responsible for promoting the integrity of the skin, their adhesion structures shown to be altered in several skin diseases. Some molecules that play the role of adherence in this membrane are the laminins, type IV collagen and type XVII and perlecan.

Objective: Analysis of protein expression of cell adhesion molecules in melanoma by immunohistochemistry on tissue microarray (TMA).

Patients and Method: We selected paraffin blocks of patients who were diagnosed with cutaneous melanoma in the period 1995 to 2010, reaching a sample of 124 cases. All these have gone through review of preparation for subsequent histological analysis of tissue microarray (TMA). The protein expression will be analyzed by immunohistochemistry, using markers anti-laminin, anti-collagen type IV and type XVII and anti-perlecan.

Partial Results: There was a predominance of female patients, Caucasians and southeastern Brazil. There were frequent in type of extensive superficial ulcers with Breslow depth greater than 4 mm, Clark level IV and mitotic index greater than 6 mitoses per cga.

Conclusions: The patients, most of them were female with mean age of 57.13 years and Caucasian. The most frequent histological type was extensive superficial followed by acral lentiginous. Predominated cases very deep, with Breslow thickness greater than 4 mm, Clark IV, ulcerated and on average by 9 cga mitosis, leading to worse prognosis in this sample. It was clear the backlog demand for medical care of these patients, as demonstrated by the high percentage of metastases in sentinel lymph nodes. The visceral metastases affect mainly the lungs and brain. The patients who died due to melanoma had a median survival of 27.7 months, confirming the high lethality of this disease. Since 85.5% had a survival rate greater than 3 years.

Keywords: Melanoma; Immunohistochemistry; Collagen IV; Collagen XVII; Laminin; Perlecan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotomicrografia do Melanoma Extensivo Superficial (HE)	4
Figura 2	Fotomicrografia do Melanoma Nodular (HE)	4
Figura 3	Fotomicrografia do Melanoma Acral Lentiginoso (HE)	6
Figura 4	Fotomicrografia do Melanoma Lentigo Maligno (HE)	6
Figura 5	Passos da Progressão Tumoral do Melanoma Cutâneo	8
Figura 6	Fotografia mostrando os tipos de lesões conforme a regra de diagnóstico ABCD	12
Figura 7	Nível de Clark e profundidade de Breslow com taxa de sobrevivência de 10 anos.	14
Figura 8	Fotomicrografia de melanoma (HE) com presença de mitose	14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Categorias do estadiamento TNM para melanoma cutâneo	11
Tabela 2	Distribuição dos Dados Demográficos	25
Tabela 3	Distribuição dos Dados Clínicos	26
Tabela 4	Distribuição das Variáveis Histopatológicas	27

ÍNDICE

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
2. INTRODUÇÃO.....	2
2.1. Melanócitos.....	2
2.2. Melanoma.....	2
2.3. Progressão Tumoral do Melanoma	7
2.3.1. Metástase.....	9
2.4. Epidemiologia	9
2.5. Fatores de risco.....	10
2.6. Diagnóstico do melanoma.....	10
2.7. Fatores histopatológicos de prognóstico	13
2.8. Biologia Molecular do Melanoma.....	15
2.9. Interação entre Melanócitos e Queratinócitos	16
2.10. Moléculas de adesão.....	16
2.11. Zona de membrana basal.....	17
3. JUSTIFICATIVA.....	20
4. OBJETIVOS.....	20
4.1. Objetivo Geral.....	20
4.2. Objetivos Específicos.....	20
5. PACIENTES E MÉTODO	21
5.1. Casuística	21
5.2. Análise histológica dos casos selecionados.....	21
5.3. Confeção do Arranjo Tecidual de Matriz (TMA).....	22
5.4. Técnica de Imunoistoquímica	22
5.4.1. Protocolo da reação imunoistoquímica	22
5.5. Análise Estatística	23
6. RESULTADOS PARCIAIS	24

6.1.1.	Dados Demográficos	24
6.1.2.	Dados Clínicos	25
6.1.3.	Dados Histopatológicos.....	26
6.1.4.	Seguimento.....	29
7.	DISCUSSÃO.....	30
8.	CONCLUSÕES	32
9.	CONHECIMENTOS ADQUIRIDOS	34
10.	ATIVIDADES REALIZADAS EM 2011	34
11.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	35
12.	BIBLIOGRAFIA.....	36

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Este projeto é constituído de diversas etapas sequenciais e interdependentes. Uma das mais importantes refere-se à seleção dos casos que tenham todas as informações necessárias, tanto clínicas como anatomopatológicas. Desta forma, foram incluídos na investigação apenas os casos que tinham disponíveis lâminas para confirmação dos diagnósticos histopatológicos e blocos de parafina suficientes para a confecção do arranjo tecidual de matriz (TMA) e posterior exame imunoistoquímico, e que, além disso, tinham informações clínicas e de seguimento nos seus prontuários médicos.

Os resultados apresentados nesta monografia referem-se à revisão de literatura, levantamento de casos até o momento, incluindo a revisão histopatológica de todos os preparados histológicos e a estatística descritiva dos aspectos mais relevantes anatomopatológicos e clínicos sobre os melanomas encontrados no Departamento de Patologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Estes são resultados parciais da investigação proposta, uma vez que a etapa de levantamento e revisão dos casos para a futura confecção do arranjo tecidual de matriz (TMA) ainda não foi concluída. A pesquisa continuará mesmo após a apresentação desta monografia.

Como o estudo abrangeu um grande período de tempo, de 1996 a 2010, os materiais (blocos de inclusão e lâminas) mais antigos encontravam-se em arquivo externo à UNIFESP, fazendo com que houvesse uma maior demora na sua avaliação e separação.

Além disto, diversas lâminas estavam em má condição de armazenamento ou não existiam, o que nos obrigou a realizar novos cortes histológicos dos blocos para revisão.

No levantamento de dados clínicos nos prontuários do Arquivo Médico da Instituição, constatou-se que muitas informações estavam incompletas, devendo ser consultados os arquivos internos dos departamentos de Cirurgia Plástica e Dermatologia da UNIFESP.

O projeto encontra-se em andamento, as etapas que faltam a serem cumpridas são a confecção do TMA, as reações de Imunoistoquímica, análise e leitura das lâminas.

Os materiais utilizados neste protocolo de pesquisa, anticorpos e kit de imunoistoquímica, já foram comprados e estão armazenados, para a realização das reações imunoistoquímicas, assim que estiver pronto o TMA.

2. INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é definido como uma neoplasia maligna advinda da proliferação celular não controlada de melanócitos cutâneos. A malignização resulta da interação de diversos fatores genéticos, constitucionais e ambientais. É considerada a principal patologia fatal originada na pele.

A seguir, abordaremos temas pertinentes ao estudo do melanoma cutâneo, como a descrição dos melanócitos, progressão tumoral, epidemiologia e diagnóstico, entre outros.

2.1. Melanócitos

Os melanócitos localizam-se na camada basal da epiderme, folículos pilosos, coróide e leptomeninges.

As células progenitoras da crista neural migram do tubo neural até a superfície dorsolateral, tornando-se células com potencial para se diferenciar em melanoblastos, neurônios, células da glia, células cardíacas e tecido craniofacial [1].

Os melanoblastos sofrem um processo de diferenciação na derme originando os pré-melanócitos precoces e intermediários, que expressam marcadores clássicos como TRP-1 (Tyrosinase-related protein 1) e tirosinase. Na pele, os melanócitos tem seu destino final nos folículos pilosos e na camada basal da epiderme, onde permanecem quiescentes [2].

Os melanócitos proliferam a partir de estímulos específicos, como a radiação ultravioleta e a cicatrização, sem estes estímulos eles permanecem quiescentes [3]. O controle desta proliferação é feito através do ciclo celular e seus sinais regulatórios.

Os melanócitos são responsáveis pela fotoproteção da pele, através da produção de melanina, pigmento marrom, que protege as células epidérmicas do dano provocado pela radiação solar.

Os melanócitos também podem atuar como células sensoriais e regulatórias, participando da homeostase cutânea pela indução de respostas neuroendócrinas e imunomodulatórias [4].

2.2. Melanoma

Neoplasia maligna originada de melanócitos que, na maioria das vezes, é originária na pele, mas pode surgir a partir de mucosas e outros locais, para onde houve migração das células da crista neural.

Os melanócitos migram, durante o processo embrionário,

da crista neural para a epiderme. Esta característica poderia explicar a grande capacidade metastatizante do tumor, já que a invasão e a disseminação são características destes tipos de célula.

A média mundial de sobrevida livre de doença por cinco anos é de 69%, sendo estimada nos países desenvolvidos em 73% e nos países em desenvolvimento em 56% [5].

Apresenta quatro subtipos mais comuns: Extensivo Superficial, Nodular, Acral Lentiginoso e Lentigo Maligno [6].

O melanoma mais comum é o do tipo **extensivo superficial**, representando 50 a 70% do melanomas cutâneos, apresenta uma longa fase de crescimento radial [7]. Pode aparecer em pacientes jovens e predominam em mulheres [8]. Sua patogênese relaciona-se à exposição intermitente à radiação ultravioleta [9]. Histologicamente, as células tumorais se apresentam com citoplasma abundante e eosinofílica, os núcleos podem ser grandes com um ou mais nucléolos proeminentes [10]. Além disso, este tipo de melanoma é caracterizado pela disseminação pagetóide, definida pela expansão descontínua de melanócitos para a epiderme superficial [11]. (*Figura 1*).

O segundo tipo mais frequente é o **nodular**, é de rápido crescimento e tende a ocorrer na cabeça e no pescoço. Na superfície cutânea aparenta um nódulo pigmentado uniforme, firme e simétrico [12]. O tumor apresenta-se com uma porção invasiva na derme e as células formam agregados que juntos dão forma ao nódulo [10]. (*Figura 2*).

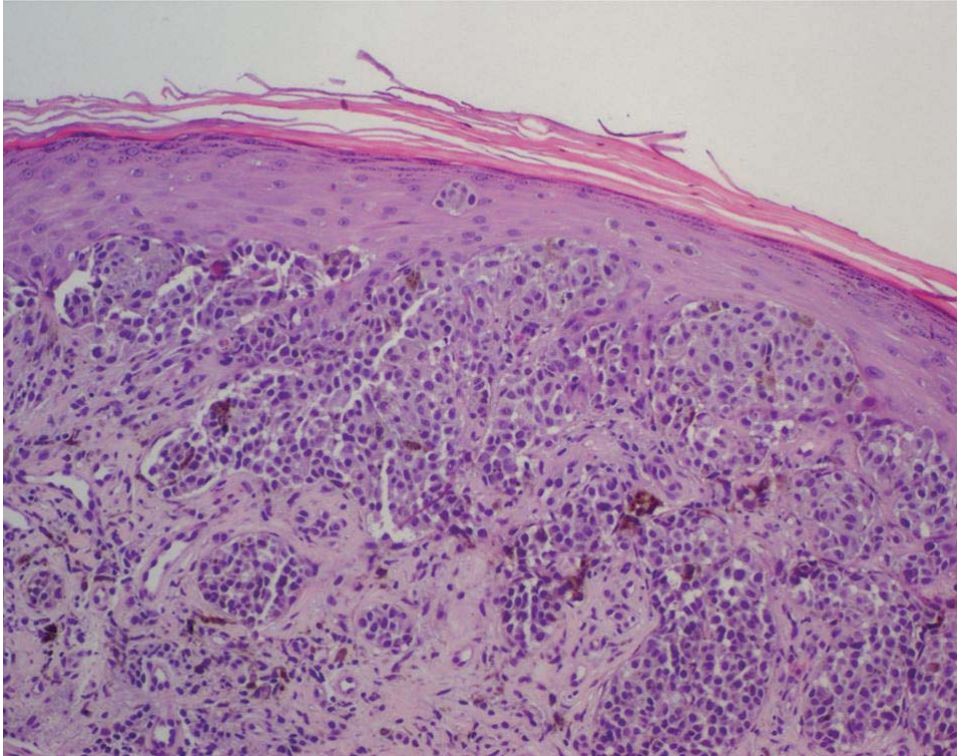


Figura 1. Fotomicrografia (400x) do Melanoma Extensivo Superficial (HE) com células predominantemente aninhadas e com migração pagetóide [13].

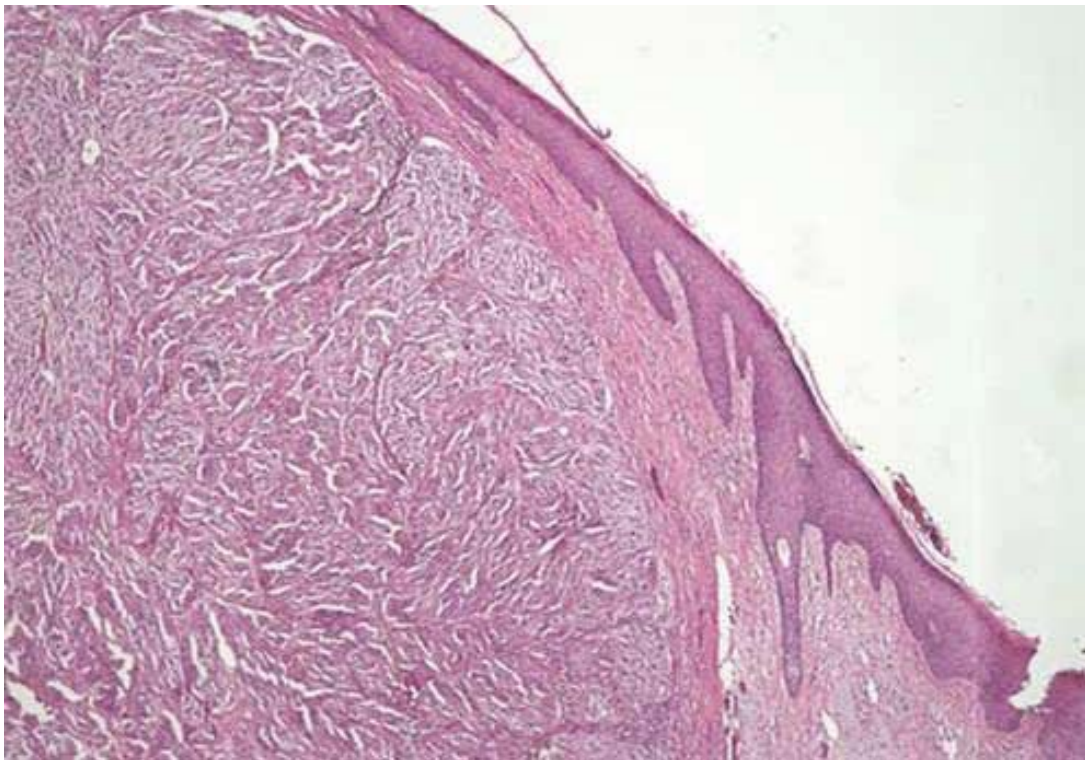


Figura 2. Fotomicrografia (400x) mostrando a circunscrição que caracteriza o Melanoma Nodular (HE) com proliferação de melanócitos atípicos, com crescimento através da derme [14].

O melanoma **acral lentiginoso** é o tipo de melanoma mais usual na população asiática e afro-descendente, a lesão é plana, com bordas irregulares e variação na cor, de marrom a preto [15]. Ocorre em locais não expostos à radiação solar, como palmas das mãos, solas dos pés e áreas subungueais. Devido ao aparecimento da lesão em regiões de difícil visualização acaba sendo diagnosticado em estádios avançados, demonstrando um pior prognóstico deste tipo de melanoma [16]. Histologicamente é possível a visualização de melanócitos dendríticos em padrão lentiginoso, seus prolongamentos se dispõem através das camadas de queratinócitos [17]. (*Figura 3*).

Já o tipo **lentigo maligno** não é muito habitual, afeta pessoas mais idosas e tem uma estreita relação com exposição solar contínua [7]. O componente intra-epidérmico é caracterizado por células tumorais isoladas na camada basal da epiderme [10]. (*Figura 4*). Os padrões histológicos, ligados ao dano solar crônico, mostram exuberante elastose solar, atrofia da epiderme e queratinócitos basais pigmentados [18].

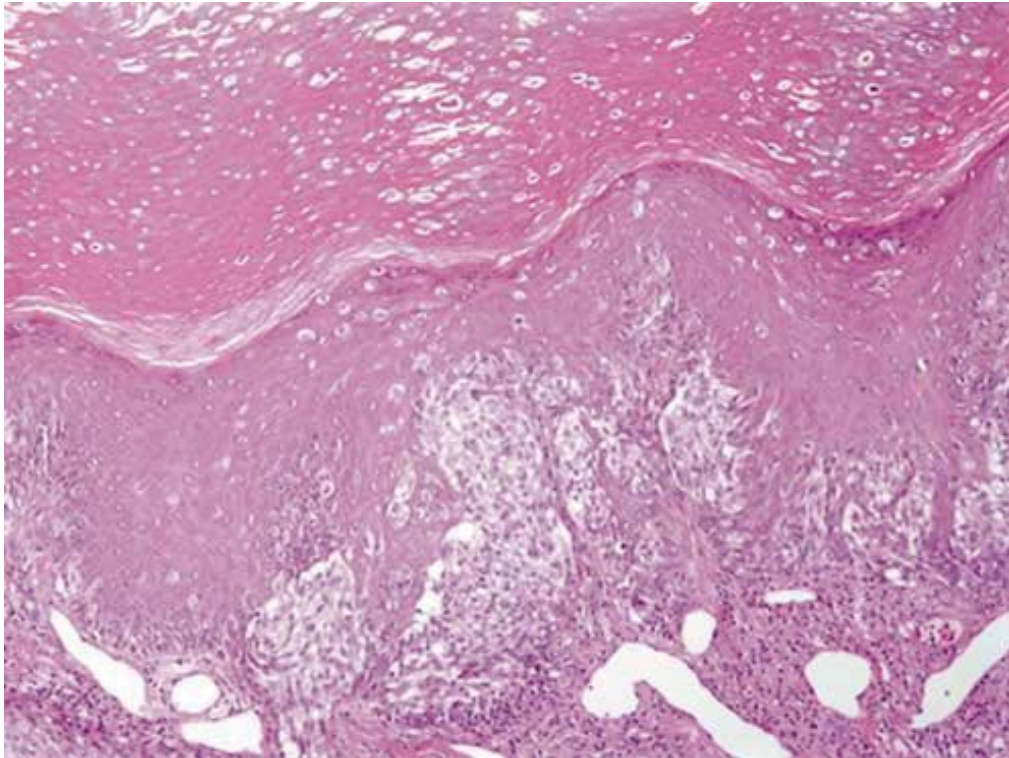


Figura 3. Fotomicrografia (400x) do Melanoma Acral Lentiginoso (HE) com melanócitos atípicos em ninhos e solitários com migração pagetóide na epiderme [14].

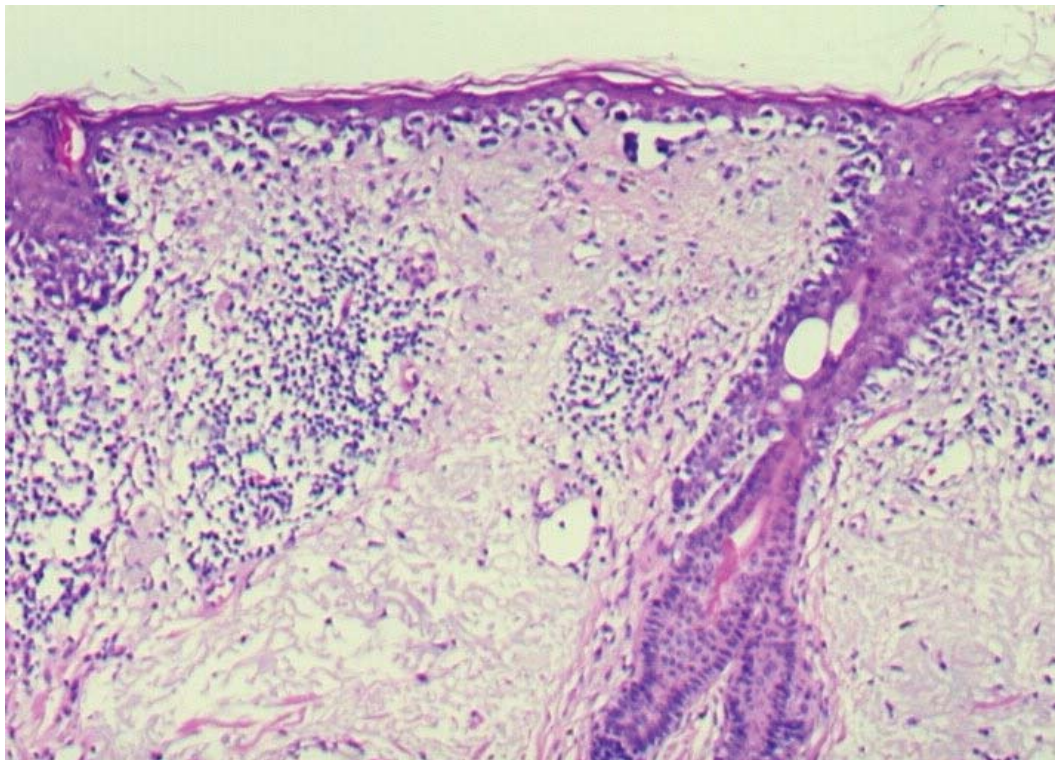


Figura 4. Fotomicrografia (400x) do Melanoma Lentigo Maligno (HE) com presença de elastose solar e melanócitos com crescimento confluyente [19].

2.3. Progressão Tumoral do Melanoma

A progressão tumoral é um processo de transformação contínua de melanócitos normais à displasia melanocítica, até alcançar as características de melanoma maligno [20].

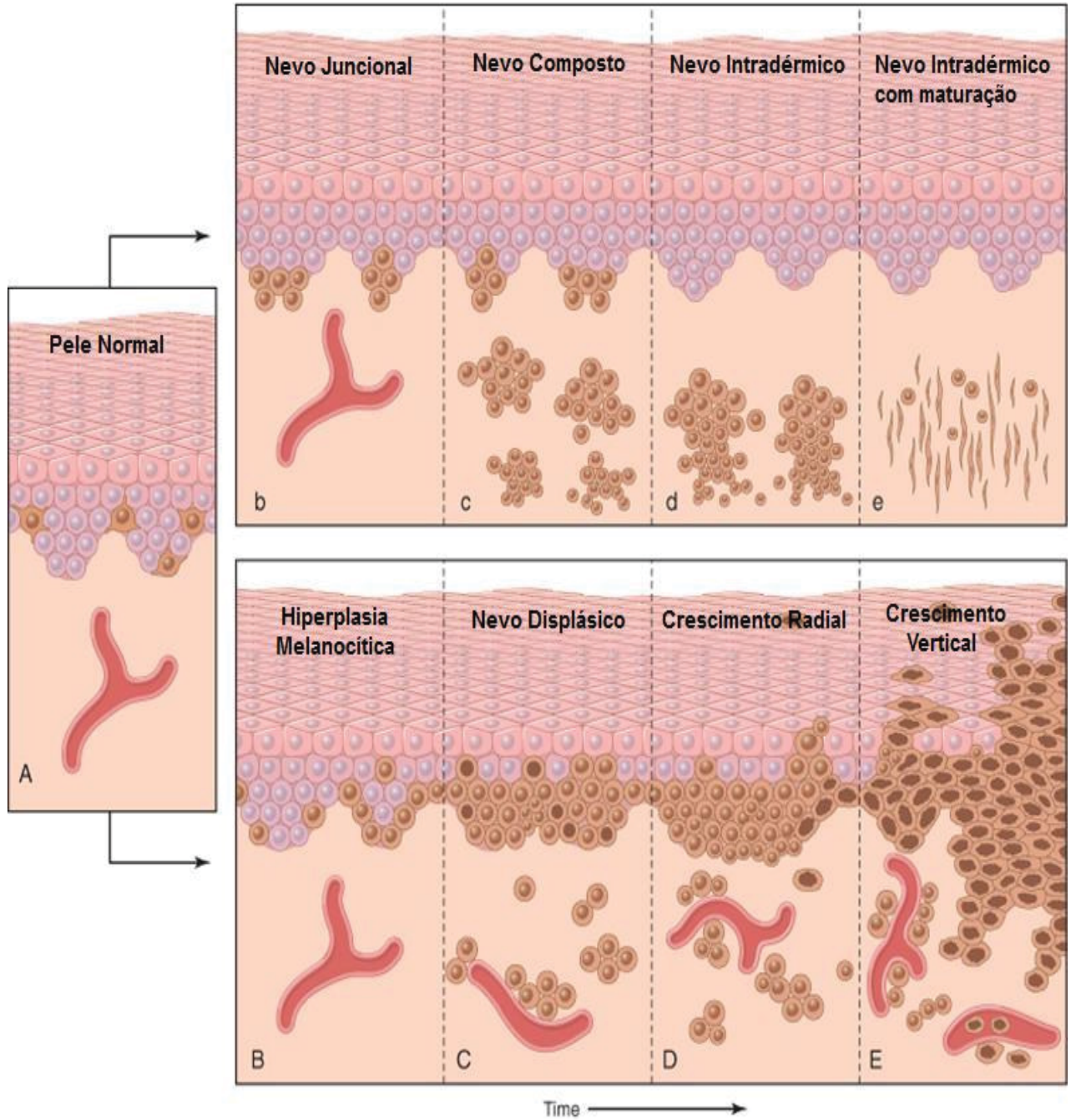
Acredita-se que a primeira etapa deste processo é o nevo melanocítico congênito ou adquirido, lesão benigna com melanócitos estruturalmente normais e sem anormalidades citogenéticas [21], acaba por constituir uma hiperplasia juncional melanocítica estável (*Figura 5 – Seção B*).

Embora ainda em discussão, a etapa subsequente seria a displasia melanocítica, na forma de nevos atípicos, com estrutura e arquitetura alteradas, devido à aquisição e acúmulo de alterações genéticas. Esta fase corresponderia ao início do processo de transformação maligna (*Figura 5 -Seção C*) [22].

Com a transformação maligna, a fase inicial de melanoma seria de crescimento radial, no qual o melanoma tende a crescer radialmente através da epiderme e das camadas superficiais da derme, apresenta baixo potencial metastatizante e sem evidências de angiogênese (*Figura 5 – Seção D*). Este crescimento aconteceria devido à autonomia parcial adquirida do crescimento celular, representada pela habilidade de proliferar independentemente e indefinidamente.

Após segue-se uma fase agressiva, de crescimento vertical, no qual as células invadem a derme de forma mais expansiva e tem alto potencial metastatizante (*Figura 5 – Seção E*) [21]. Nesta fase, as células do melanoma adquirem maior capacidade autoproliferativa, de sobrevivência e de invasão, mas não proporcionam maturação a essas células.

O estadio, mais avançado é caracterizado pela metástase do melanoma. Usualmente os melanomas disseminam-se por via linfática, aos linfonodos regionais, podendo também disseminar-se por via hematogênica, comprometendo pulmões, cérebro e fígado.



© Elsevier. Kumar et al: Robbins Basic Pathology 8e - www.studentconsult.com

Figura 5. Passos da Progressão Tumoral do Melanoma Cutâneo [23].

2.3.1. Metástase

Para sucessão do processo metastático é preciso que haja interações entre as células tumorais e as células adjacentes ao tumor. Além disso, a instalação da metástase depende de fatores mecânicos, compatibilidade biológica, capacidade de sobrevivência destas células na circulação hematogênica ou linfática e tipo de invasão tumoral [24].

A metástase dá-se pela dissociação das células do tumor primário, as quais se infiltram no estroma e entram na circulação sanguínea ou linfática, responsável por levar estas células para locais distantes, assim elas extravasam da vasculatura e invadem o tecido [25].

Essas células podem seguir três caminhos, formar uma massa tumoral no tecido, permanecer silenciadas ou morrer [25].

2.4. Epidemiologia

Houve um aumento de incidência e mortalidade do melanoma cutâneo durante as últimas décadas, substancialmente na população caucasiana, enquanto outros tipos tumorais apresentaram decréscimo na sua incidência. Mesmo assim, percebe-se uma ligeira melhora na sobrevivência dos pacientes portadores de melanoma, explicada pela maior quantidade de informações veiculadas e consequente detecção precoce da doença [26].

O melanoma cutâneo invasivo tem incidência variável, indo de 0,59/100000 habitantes, em alguns países, chegando até a maior taxa, que ocorre em Queensland, na Austrália, de 55,8 homens por 100000 habitantes e em 41,1 mulheres por 100000 habitantes, sendo mais alta do que em qualquer país europeu [27]. Na Austrália o aumento anual de casos a cada ano chega a 3,17% em homens e 0,45% em mulheres [28].

Na América do Norte a incidência em 1965 era de 1 a cada 150 habitantes, já em 2010 essa taxa foi para 1 em cada 39 habitantes [29] [30]. Estima-se que 1 em cada 5 americanos irão desenvolver melanoma em sua vida, contribuindo para 1 milhão de novos casos por ano [31].

Segundo estimativas de 2010 do Instituto de Câncer (INCA), previu-se 2960 novos casos em mulheres e 2970 novos casos em homens. No Brasil, as maiores taxas de casos de melanoma ocorrem na região sul do país [5], taxas justificáveis pela cor da pele e também pela alta incidência solar, dada pela posição geográfica da região. O estado de Santa Catarina apresenta a maior taxa no Brasil, seguido pelo Rio Grande do Sul (em homens: 8,2 novos casos por 100000 habitantes; em mulheres: 7,29 novos casos por 100000 habitantes) [26].

2.5. Fatores de risco

Os fatores de risco podem ser divididos em genéticos e ambientais, podendo haver interação entre esses dois tipos.

Estudos demonstram que a exposição à luz UV-B pode aumentar o risco de desenvolvimento de melanoma, comportando-se como um iniciador e promotor tumoral, por indução de mutações genômicas [32]. Um aumento de 10% na exposição à UVB aumenta em 19% o risco de melanoma [33].

O nascimento ou a residência nos primeiros anos de vida em lugares com alta radiação ultravioleta pode ser considerado um fator de risco para o melanoma, já que a exposição solar é cumulativa. Além disso, dependendo do tipo de exposição crônica, ocorre o desenvolvimento de um tipo específico de melanoma. A Sociedade Americana de Câncer demonstrou que em 2007, aproximadamente 60 mil novos casos de melanoma ocorreriam devido a exposição excessiva à radiação UV [5].

Os fatores ligados ao fenótipo do indivíduo podem se relacionar ao maior risco de desenvolvimento do melanoma, como a cor clara em cabelos, olhos e pele, além daqueles que apresentam mais queimaduras solares.

Existem estudos que demonstram a associação entre a presença de nevos atípicos e o risco aumentado para conceber o melanoma [34].

A susceptibilidade genética também é importante, encontrando-se em pacientes portadores de melanoma, mutação no locus CDKN2A. O segundo gene ligado aos fatores de risco é o CDK4, que foi identificado em cinco famílias afetadas pelo melanoma no mundo [35].

2.6. Diagnóstico do melanoma

De acordo com o “*American Joint Committee on Cancer*”, todo paciente portador de melanoma deve ter estadiamento clínico (EC), o qual pode ser visto na *Tabela 1*:

Tabela 1. Categorias do estadiamento TNM para melanoma cutâneo [36]

<i>T</i>	<i>Espessura (mm)</i>	<i>Ulceração/Mitoses</i>
Tis	Não Aplicável	Não Aplicável
T1	≤ 1,00	a: Sem ulceração e mitoses < 1/mm ² b: Com ulceração ou mitose ≥ 1/mm ²
T2	1,01 – 2,00	a: Sem ulceração b: Com ulceração
T3	2,01 – 4,00	a: Sem ulceração b: Com ulceração
T4	> 4,00	a: Sem ulceração b: Com ulceração
<i>N</i>	<i>Número de nódulos metastáticos</i>	<i>Nódulos Metastáticos</i>
N0	0	NA
N1	1	a: Micrometástases b: Macrometástases
N2	2 – 3	a: Micrometástases b: Macrometástases c: Metástases em trânsito/satelitoses sem nódulos metastáticos
N3	4 ou mais nódulos metastáticos ou metástases em trânsito ou satelitose com nódulos metastáticos	
<i>M</i>	<i>Local</i>	
M0	Sem metástases a distância	
M1a	Diferente de pele, subcutâneo ou metástase nodal	
M1b	Metástase pulmonar	
M1c	Metástases em outras vísceras Metástase à distância	

A progressão de nevos melanocíticos em melanoma pode ser diagnosticada baseada em uma análise quantitativa de quatro critérios (Regra do *ABCD*): Assimetria da lesão, ao dividir a lesão no meio, as duas metades não coincidem (*Figura 6A*); irregularidade no contorno das Bordas (*Figura 6B*); variação na Cor, com presença de duas ou mais cores (*Figura 6C*); e Diâmetro maior que 6 mm (*Figura 6D*) [37]. Este método diagnóstico ganhou mais um critério, a Evolução da lesão, dado pelo crescimento desta [38].

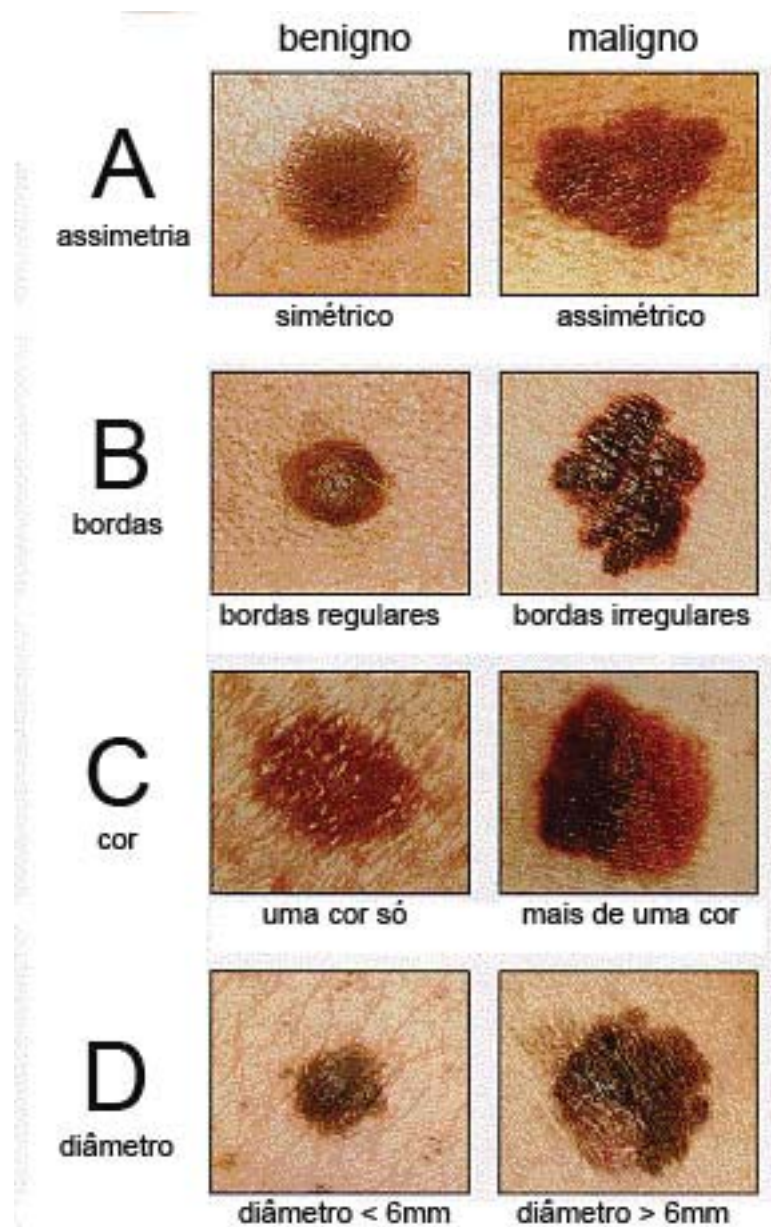


Figura 6. Fotografia mostrando os tipos de lesão conforme a regra de diagnóstico ABCD [39].

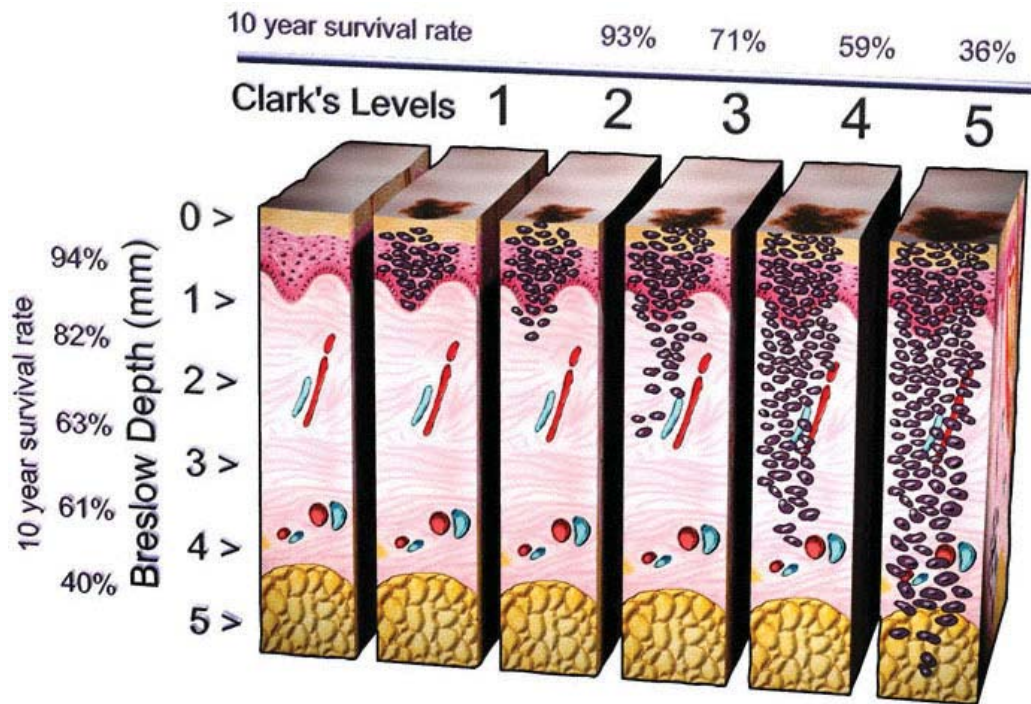
2.7. Fatores histopatológicos de prognóstico

O melanoma é uma neoplasia com bom prognóstico quando diagnosticada precocemente. A transição de crescimento radial (crescimento horizontal) para crescimento vertical (crescimento em profundidade) garante ao tumor alto poder invasivo.

Um dos fatores que se correlaciona com o prognóstico é o nível de Clark (*Figura 7*), o qual corresponde à invasão das estruturas anatômicas da pele, estratificando a lesão em cinco níveis: I) Melanoma presente somente na epiderme, ausência de invasão da derme papilar; II) Invasão da derme papilar, mas com um pequeno número de células de melanoma atingindo a interface entre a derme papilar e reticular; III) Comprometimento de toda a derme papilar, sem invadir a derme reticular; IV) Invasão da derme reticular e V) Invasão da hipoderme (chegando ao tecido adiposo).

A profundidade de infiltração segundo Breslow (*Figura 7*), padrão ouro na estimativa do prognóstico, tem correlação com o volume da neoplasia. A invasão é quantificada em milímetros, a partir da camada granulosa da epiderme até a célula neoplásica mais profunda encontrada [40]. Os pacientes com melanomas que apresentam espessura menor que 1,0 mm (conhecidos como melanomas finos) tem sobrevida de 95% em cinco anos, porém se houver aumento da espessura, o índice de sobrevida diminui [41]. Além de estar ligada a sobrevida, as lesões mais espessas apresentam maior risco de metástase linfonodal [42].

De acordo com “*American Joint Committee on Cancer*”, o número de mitoses é considerado um fator de prognóstico independente [43]. A contagem de mitoses encontrada na área invasiva do tumor (*hot spot*) influencia a sobrevida livre da doença [44]. As mitoses são caracterizadas em número por milímetro quadrado (*Figura 8*).



2001 Image by Med-Art ~ <http://www.med-ars.it>

Figura 7. Nível de Clark e profundidade de Breslow com taxa de sobrevivência de 10 anos.

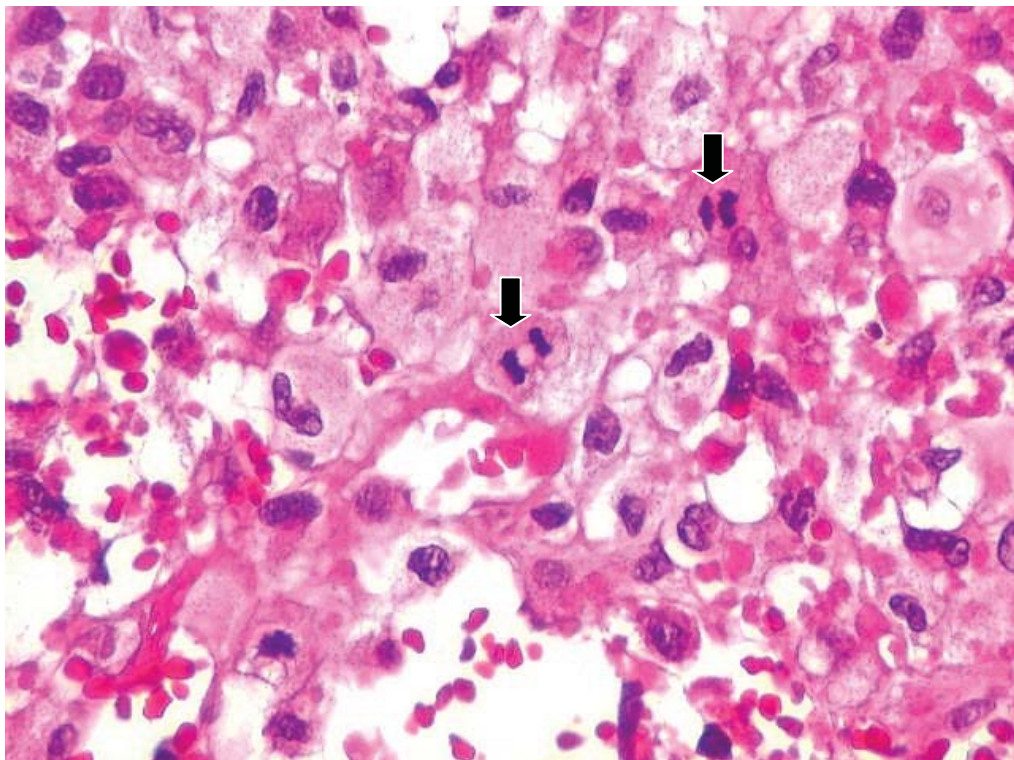


Figura 8. Fotomicrografia de melanoma (HE) com presença de mitoses, indicadas pelas setas. Aumento de 400x. (Neupatimagem, UNICAMP).

A presença de infiltrado inflamatório tem relação com a capacidade de resposta do paciente, sendo considerada como variável independente [45].

A ulceração é a perda da continuidade da epiderme, substituída por tampão fibrino-leucocitário sobre a lesão primária, em consequência da invasão neoplásica [46]. Este fator é considerado de pior prognóstico do tumor primário, demonstrando uma alta capacidade metastatizante [46].

A regressão histológica é uma área, onde há perda das células neoplásicas na epiderme e na derme, no lugar das mesmas encontra-se tecido fibroso e aumento da vascularização [45]. Ao contrário do que seria esperado, a regressão é vista como um fator de pior prognóstico, já que indica uma evolução mais reservada, mostrando que antes do processo regressivo a neoplasia estaria com uma profundidade maior do que a encontrada. Outra explicação plausível para esta hipótese é a que indica que o sistema imune reconheceria os clones selecionados das células neoplásicas, destruindo-os e selecionando clones mais resistentes à resposta imune do hospedeiro [45]. Entretanto, investigações recentes contestam esta afirmação, demonstrando que a regressão, como o infiltrado inflamatório intratumoral, são fatores de melhor prognóstico [47] [48]

2.8. Biologia Molecular do Melanoma

Uma célula de melanoma apresenta uma quantidade importante de aberrações no DNA, pelo ganho de função dos oncogenes ou pela perda de função dos genes supressores tumorais.

A transformação maligna por instabilidade genética pode ser explicada por mutações em B-RAF juntamente com a deleção de PTEN ou por mutações em N-RAS [22], além da perda de p16 e a amplificação de ciclinas dependentes de quinase (CdKs) e ciclina D1 [49], entre outros.

A disfunção de p16 leva a um crescimento descontrolado dado pela falta de inibição de CdK, no estudo de Soares de Sá e col. [50] praticamente todos os melanomas deixaram de expressar p16.

Um em cada três pacientes com melanoma apresentam mutação germinativa de CdKN2A, no cromossomo 9p21, gene indispensável no controle do ciclo celular [51].

2.9. Interação entre Melanócitos e Queratinócitos

A unidade pigmentar epidérmica apresenta-se como uma associação entre um melanócito e aproximadamente 36 queratinócitos. Estas células aparecem alinhadas ao longo da membrana basal numa razão de 1 melanócito para 5 queratinócitos [52].

A proliferação dos melanócitos depende da perda de contato deste com o queratinócito e consequente retração dos dendritos dos melanócitos. Depois de ocorrida a divisão, os melanócitos migram pela lâmina basal e estabelecem outras interações formando uma nova unidade pigmentar epidérmica [52]. Com este comportamento é possível manter a homeostasia, pois se houvesse um distúrbio no balanço da unidade epidermal melanocítica haveria o desenvolvimento do nevo ou até de um melanoma.

Esta falta de contato entre queratinócitos e melanócitos, leva esta última célula a se proliferar rapidamente e a expressar moléculas na superfície que possam estar associadas com o desenvolvimento do melanoma. Neste conjunto encontra-se a molécula de adesão celular do melanoma, a MCAM/MUC18, que tem sido correlacionada diretamente com a progressão tumoral e o potencial metastático [25].

Além da regulação proliferativa dos melanócitos, os queratinócitos também são responsáveis pela expressão de moléculas de superfície, crescimento dendrítico e pela quantidade mínima de melanina encontrada nos melanócitos, funções realizadas através de fatores de crescimento e moléculas de adesão célula-célula [53].

Uma importante função do melanócito é a produção e transferência de melanina para os queratinócitos vizinhos, protegendo-os dos efeitos adversos da radiação UV, esta transferência ocorre com ajuda dos inúmeros dendritos dos melanócitos [54].

2.10. Moléculas de adesão

Os melanócitos aderem aos queratinócitos via junções comunicantes, além das moléculas de E-caderina e da desmogleína.

Devido ao seu papel, as junções comunicantes são importantes na manutenção da homeostasia do tecido, por formarem canais hidrofílicos entre células adjacentes, que possibilitam a difusão passiva de algumas moléculas sinalizadoras [55]. Essas junções são formadas por dois hemicanais chamados conexons, os quais são formados por seis proteínas transmembrânicas, as conexinas. O tipo de conexina empregada influencia a especificidade e seletividade do canal [55]. A afinidade desta junção intervém no crescimento e diferenciação do queratinócito e na interação deste com o melanócito. As junções comunicantes

intracelulares estão ligadas ao crescimento de fibroblastos e células epiteliais, demonstrados pela expressão dos genes da conexina [56].

As junções comunicantes são moduladas por agentes promotores de tumor, fatores de crescimento e oncogenes, a regulação ocorre pela fosforilação de conexinas por produtos desses oncogenes [57]. Por exemplo, a conexina-43 que sofre fosforilação pelo produto do oncogene v-src, bloqueia a comunicação intercelular. As conexinas 26 e 43 são vistas como genes supressores de tumor, pois quando expressas revertem a transformação maligna do fenótipo de células mamárias; diversos estudos demonstram que células transfectadas com cDNA de conexina-43 apresentam proliferação controlada [58].

A caderina é uma família de moléculas de adesão celular, que participa da comunicação intracelular. Quando há alteração no seu subtipo ocorre uma mudança na separação de células de tecidos diferentes e na manutenção arquitetural dos tecidos [25]. Os tipos E-caderina e P-caderina são responsáveis por mediar a adesão célula-célula dependente de Ca^{2+} . A E-caderina é identificada como uma molécula mediadora da interação entre os queratinócitos e entre queratinócitos e outras células [54].

Ao se estudar a progressão do melanoma percebeu-se que ocorre a perda da função de E-caderina e um ganho na expressão de N-caderina, o que pode promover sinais inapropriados. A expressão de N-caderina facilita a ligação de células melanocíticas com fibroblastos e com células endoteliais, facilitando o extravasamento das células de melanoma para a circulação e consequente migração das mesmas [59] [60] [61]. Quando ativada, a E-caderina retarda o crescimento e pode reverter o fenótipo invasivo em células do melanoma [60], porém não existem evidências de que a baixa de E-caderina funcione como um promotor do melanoma.

A desmogleina (Dsg) é uma importante glicoproteína que participa da formação e manutenção dos desmossomos. Quando existem auto-anticorpos contra esta proteína, o indivíduo desenvolve patologias auto-imunes da pele [62]. Nos seres humanos aparecem três isoformas de desmogleina, a Dsg1, encontrada nas camadas superiores do epitélio; Dsg2, expressa em todos tecidos que contem desmossomos; e Dsg3, encontrada nas camadas basal e suprabasal do epitélio estratificado [63].

2.11. Zona de membrana basal

A zona de membrana basal consiste numa organização de diversas estruturas especializadas em adesão celular, que promovem a integridade da pele. Além disso, cria uma barreira de permeabilidade e liga o citoesqueleto da epiderme basal às fibrilas intersticiais de colágeno, na derme papilar.

A adesão celular é dada pelos hemidesmossomos dos queratinócitos, formados pela junção da plectina, do BPAG1 e 2, da integrina $\alpha 6\beta 4$ e do colágeno tipo XVII.

Os filamentos de ancoragem formam-se a partir da associação do colágeno tipo XVII, da integrina $\alpha 6\beta 4$ e de duas proteínas extracelulares, a laminina-332 e a laminina-311. Quando essas lamininas se juntam com outras moléculas, como a laminina-511, o colágeno tipo IV e o nidogen, originam a lâmina densa [64].

a. Lamininas

Esta família de glicoproteínas apresenta um papel essencial na ancoragem da matriz extracelular de células e tecidos, funcionando como facilitadores de adesão. As lamininas, ao interagirem com algumas células, influenciam a proliferação, a adesão e a migração das mesmas.

Apresentam um domínio C-terminal, importante para a interação desta proteína com os receptores de superfície celular, e também possuem um domínio N-terminal, agindo na interação da laminina com outras moléculas de matriz extracelular [65].

A laminina-332 é conhecida por iniciar a formação do hemidesmossomo [66], sintetizada e secretada numa forma precursora pelos queratinócitos. Esta proteína encontra-se implicada em diversas doenças bolhosas e em ferimentos na pele, já foi verificada a deposição desta durante a migração e hiperproliferação dos queratinócitos.

Ao interagir com receptores epiteliais específicos forma um tipo de estrutura de fixação, quando interage com a integrina $\alpha 3\beta 1$ forma a adesão focal [67], um tipo de adesão de curto prazo, porém ao interagir com a integrina $\alpha 6\beta 4$ constitui uma ancoragem de contato estável, esta confere maior resistência a forças externas [68].

No melanoma, a laminina-332 mostrou-se essencial na fixação e migração destas células, devido à regulação feita pelos queratinócitos através desta mesma laminina [69].

Outro tipo de laminina é a 311, que compartilha com a laminina-332 o mesmo domínio de integrina, mas a primeira regula diferentemente a migração e adesão celular [70].

b. Colágeno Tipo IV

O colágeno tipo IV juntamente com a laminina desempenha importantes funções de adesão, migração, diferenciação e crescimento celular, sendo assim definido como um componente principal da membrana basal. As cadeias do colágeno IV são codificadas por 6 genes, presentes em 3 cromossomos diferentes, 13q34, 2q36 e Xq22.2 [71].

Quando o colágeno IV se conecta à integrina $\alpha 2\beta 1$ de alta afinidade, ocorre uma intervenção na adesão e motilidade das células do melanoma, originando um sinal transdutor responsável por induzir a metaloproteinase 1 [72].

Foi determinado que o processo normal de produção e montagem da membrana basal quando interrompido, se associa com diferentes estágios de carcinoma invasivo [71]. Outro ponto importante é a influência dos produtos de degradação do colágeno IV na angiogênese, remodelação do tecido e progressão cancerígena [73] [74].

c. Colágeno tipo XVII

O colágeno XVII é uma proteína transmembrana expressa por células epiteliais, faz parte da placa de fixação dos hemidesmossomos, atrelando o citoesqueleto ao ambiente extracelular [75], transmitindo sinais da matriz extracelular para o ambiente interno durante a migração celular [76].

Mutações no gene *COL17A1* acarretam uma deficiência na expressão de colágeno XVII, reduzindo o tamanho do hemidesmossomo e a adesão dos queratinócitos à membrana basal [77], aumentando a separação da pele e a migração das células.

A deficiência de colágeno XVII induz um fenótipo migratório. Acredita-se, que *in vivo* a desmontagem dos hemidesmossomos é um pré-requisito para levar à migração dos queratinócitos [78].

d. Perlecan (Proteoglicano de Heparan Sulfato)

O Perlecan é um dos principais componentes da matriz extracelular e é notório pelo seu papel na migração, adesão e proliferação celular [79]. O perlecan está expresso em todas as membranas basais, em particular no subendotélio de vasos sanguíneos, influenciando o extravasamento de células malignas [80].

Este proteoglicano mostra ser um promotor do processo de progressão tumoral, podendo ser devido ao armazenamento de fatores angiogênicos [81]. A expressão de perlecan em melanomas invasivos pode ser vista como um marcador para um fenótipo agressivo.

3. JUSTIFICATIVA

O melanoma apresenta-se como uma neoplasia de incidência crescente no mundo, observado pelas taxas de incidência e morte maiores que outras neoplasias malignas. Existem diversos estudos abrangentes, tanto em genes do ciclo celular, como em expressão de moléculas de adesão. Estas últimas já foram bem elucidadas, porém as estruturas de adesão que fazem parte da zona de membrana basal não foram muito investigadas. Mesmo sabendo que estas moléculas estão ligadas a outras patologias epiteliais, não há comprovações do seu verdadeiro papel no desenvolvimento do melanoma.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Analisar a expressão imunoistoquímica de moléculas de adesão celular em melanoma.

4.2. Objetivos Específicos

1. Criar um banco de dados com características clínicas e anatomopatológicas de pacientes portadores de melanoma do Hospital São Paulo.
2. Analisar, pela técnica de imunoistoquímica, a expressão de laminina, colágeno tipo IV, colágeno tipo XVII e Perlecan, em melanomas acondicionados em Arranjo Tecidual de Matriz (TMA).
3. Correlacionar os dados morfológicos com os marcadores estudados e, quando pertinente, dados clínicos.

5. PACIENTES E MÉTODO

Para fazer parte deste estudo foram selecionados pacientes diagnosticados com melanoma cutâneo no serviço de dermatologia do Hospital São Paulo, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

5.1. Casuística

O primeiro levantamento feito apresentou 460 casos de melanoma cutâneo primário. Porém foi observado que, por ser um serviço de referência, este seria um número inferior ao esperado, por isso recentemente uma nova pesquisa foi realizada, a qual produziu mais 183 casos. Assim a amostra inicial era formada por 643 casos.

Do total de casos, 271 pacientes foram retirados do estudo devido às condições referidas nos seguintes critérios de exclusão:

- a. Ausência do bloco de parafina no arquivo do Departamento de Patologia, da Universidade Federal de São Paulo ou blocos que não tenham material suficiente para confecção do tissue microarray.
- b. Casos revisados por análise histológica que não cobrem as especificações do estudo.
- c. Pacientes com mais de um melanoma primário cutâneo ou outra neoplasia sistêmica.
- d. Aqueles com ausência de informações clínicas.

Sendo assim, a amostra final é constituída de 124 casos de melanoma, do período de 1996 a 2010, com seguimento clínico colhido dos prontuários individuais no Serviço de Arquivo Médico (SAME) da Instituição. Além disso, existem 248 casos que ainda terão seus prontuários pesquisados nos Departamentos de Dermatologia e Cirurgia Plástica da UNIFESP, pois não foi possível obter as informações clínicas referentes à lesão nos prontuários lidos no SAME.

5.2. Análise histológica dos casos selecionados

Todos os casos selecionados para o estudo foram revistos para avaliação de critérios anatomopatológicos: tipo histológico, tipo de crescimento (radial ou vertical), profundidade de infiltração segundo Breslow, nível de Clark, número de mitoses, presença de regressão histológica, embolização angiolinfática, invasão perineural, presença de ulceração e satelitose.

5.3. Confeção do Arranjo Tecidual de Matriz (TMA)

Depois da análise da lâmina, corada por hematoxilina e eosina, dos casos, será identificada a área neoplásica de interesse, para posterior punção do local escolhido no bloco doador. Serão escolhidas duas áreas neoplásicas com diferença no tipo celular identificado. O cilindro retirado do bloco será transferido para o bloco receptor, com auxílio do equipamento *tissue microarrayer*. Quando este bloco estiver pronto, as lâminas providas do TMA deverão ser confeccionadas de acordo com o número necessário para uso dos anticorpos.

5.4. Técnica de Imunoistoquímica

Serão avaliados os seguintes marcadores biológicos nas lâminas preparadas pelo *tissue microarray*:

- Anti-Laminina – Rabbit polyclonal anti-human – Clone Abcam cat. ab11575
- Anti-Colágeno IV - Rabbit polyclonal anti-human – Clone Abcam cat. ab6586
- Anti-Colágeno XVII - Mouse monoclonal anti-human – Clone NC16A-3 Abcam cat. ab79878
- Anti-Perlecan - Mouse monoclonal anti –human - Clone A76 Abcam cat. ab26265

5.4.1. Protocolo da reação imunoistoquímica

1. Corte do material e confecção das lâminas silanizadas, que permanecerão por 24 horas em estufa a 60°C.
2. Estas lâminas serão submetidas a desparafinização em 2 soluções de xilol 100% por 5 minutos cada.
3. Posteriormente, realizará a preparação das lâminas através de passagens sucessivas em etanol a cada 5 minutos (100%, 95% e 70%) e então lavagem em água corrente por 5 minutos.
4. As lâminas são submetidas à recuperação antigênica pelo calor, utilizando-se panela de pressão (Eterna®, Nigra) e solução tampão citrato 10mM pH 6,0.
5. A seguir, será realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol.), com quatro trocas de 5 minutos cada, seguidas de lavagens com solução salina tamponada com fosfatos (PBS - phosphate buffered saline - 10 mM e pH 7,2) por 5 minutos.
6. As lâminas serão incubadas com o anticorpo primário diluído em tampão PBS, contendo albumina bovina (BSA) a 1% por 1 hora, a temperatura ambiente, em câmara úmida. A titulação será estabelecida em tecidos controle previamente ao experimento. Após a

incubação, lavam-se as lâminas em tampão PBS adicionado de detergente tween com três trocas de 3 minutos cada.

7. Inicia-se, então, a incubação das lâminas com o anticorpo secundário biotinizado-reagente C (Biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig) do kit StreptABCComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (Dako A/S), diluído em PBS, por 30 minutos a temperatura ambiente e posterior lavagem em tampão PBS e detergente tween com três trocas de 3 minutos cada.

8. Incubar o complexo reagente A (Streptavidin) no título preestabelecido de 1:200 e reagente B (Biotinylated Peroxydase) no título preestabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C e posterior lavagem em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada.

9. As lâminas serão incubadas em solução cromógena de fosfatase alcalina (kit Envision/Dako) por 15 minutos.

10. Após a observação do desenvolvimento do precipitado vermelho, as lâminas serão lavadas em água corrente por 5 minutos e contracoradas com Hematoxilina de Harris (Merk) por 30 segundos.

11. Segue-se, a montagem das lâminas para posterior leitura.

12. As reações serão acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado, e controle negativo, realizado pela omissão do anticorpo primário.

5.5. Análise Estatística

Para relacionar as variáveis histológicas e a expressão dos marcadores pesquisados neste trabalho será utilizado o teste de associação qui-quadrado ou o teste de Fisher.

A análise de sobrevida será feita através do método de Kaplan-Meier e para comparação das curvas será utilizado o teste de log-rank.

Todos os resultados dos testes serão considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo sob o nº 0527/11

6. RESULTADOS PARCIAIS

Neste relatório apresentamos os resultados parciais, devido ao não cumprimento do cronograma sugerido, decorrente da dificuldade no levantamento dos casos, conforme explicitado nas “*Considerações Iniciais*”.

6.1.1. *Dados Demográficos*

A análise dos dados demográficos referentes aos 124 pacientes está demonstrada na *tabela 2*. A média de idade ao diagnóstico é de 57,13 anos, variando entre 13 e 85 anos, sendo 65 (52,4%) mulheres e 59 (47,6%) homens. A maior frequência étnica foi de caucasianos com 92 (74,2%) pacientes, seguida dos pardos com 27 (21,8%). A região do país com maior número de casos é a sudeste com 78 (62,9%), destes 66 pacientes são do estado de São Paulo.

Tabela 2. Distribuição dos dados demográficos

<i>Variável</i>	<i>Categorias</i>	<i>Frequência</i>	<i>Percentual</i>	<i>Percentual Acumulado</i>
Sexo	Feminino	65	52,4	52,4
	Masculino	59	47,6	100
	Total	124	100	
Etnia	Caucasiano	92	74,2	74,2
	Amarelo	0	0	74,2
	Pardo	27	21,8	96
	Negro	4	3,2	99,2
	Sem informações	1	0,8	100
	Total	124	100	
Naturalidade (Localização Geográfica)	Sul	3	2,4	2,4
	Sudeste	78	62,9	65,3
	Nordeste	37	29,9	95,2
	Norte	0	0	95,2
	Centro Oeste	0	0	95,2
	Sem informações	6	4,8	100
	Total	124	100	

6.1.2. Dados Clínicos

As variáveis clínicas estão descritas na *tabela 3*.

Apenas 11 (8,9%) indivíduos apresentaram recidiva local do melanoma cutâneo.

De toda a amostra 88 (71%) pacientes fizeram a pesquisa de linfonodo sentinela, destes 34 (38,6%) foram positivos e 21 (23,9%) negativos.

Foi observada a presença de metástase em 39 (31,5%) pacientes, enquanto em 49 (39,5%) não ocorreu. Naqueles com metástase, 19 (47,5%) pacientes apresentaram acometimento de víscera, as mais frequentes foram pulmão e cérebro, com 9 (47,4%) e 7 (36,8%) casos, respectivamente.

Tabela 3. Distribuição dos dados clínicos

<i>Variável</i>	<i>Categorias</i>	<i>Frequência</i>	<i>Percentual</i>	<i>Percentual Acumulado</i>
Recidiva	Presente	11	8,9	8,9
	Ausente	113	91,1	100
	Total	124	100	
Pesquisa LNS	Sim	88	71	71
	Não	21	16,9	87,9
	Sem informação	15	12,1	100
	Total	124	100	
Metástase	Presente	39	31,5	31,5
	Ausente	49	39,5	71
	Sem informação	36	29	100
	Total	124	100	

6.1.3. Dados Histopatológicos

As características histopatológicas foram verificadas por revisão das lâminas e consulta aos laudos anatomopatológicos de cada paciente. Estas variáveis se encontram descritas na *tabela 4*.

O tipo histológico com maior incidência foi o extensivo superficial com 47 (37,9%) casos, seguido do tipo acral lentiginoso com 34 (27,4%) pacientes. A profundidade de Breslow variou entre 0,2 e 36 mm, com média de 5,42 mm, apresentando 53 (42,7%) amostras com espessura maior que 4 mm. Quanto à invasão segundo nível de Clark, 59 (47,5%) casos apresentaram nível IV e outros 32 (25,8%) com nível de Clark III.

O índice mitótico variou de 0 a 50 mitoses por 10 campos de grande aumento (cga), com média de 9,1 mitoses. Na amostra 61 (49,2%) pacientes tinham o tumor primário ulcerado.

Quanto ao infiltrado inflamatório, o tipo peritumoral esteve presente em 85 (68,5%) casos e o tipo intra-tumoral em 66 (53,2%) pacientes.

A invasão vascular esteve presente em 24 (19,4%) pacientes, enquanto a invasão perineural foi vista somente em 10 (8,1%) casos.

A regressão apareceu em 20 (16,1%) pacientes e a presença de satelitose esteve em 9 (7,3%) casos.

Tabela 4. Distribuição das variáveis histopatológicas

<i>Variável</i>	<i>Categorias</i>	<i>Frequência</i>	<i>Percentual</i>	<i>Percentual Acumulado</i>
Tipo histológico	Extensivo Superficial	47	37,9	37,9
	Nodular	28	22,6	60,5
	Lentigo Maligno Melanoma	7	5,6	66,1
	Acral Lentiginoso	34	27,4	93,5
	Outros	8	6,5	100
	Total	124	100	
Breslow	≤ 1	21	16,9	16,9
	$> 1,01 \leq 2,0$	21	16,9	33,8
	$> 2,01 \leq 4$	19	15,4	49,2
	> 4	53	42,7	91,9
	Sem informação	10	8,1	100
	Total	124	100	
Clark	I	0	0	0
	II	10	8,1	8,1
	III	32	25,8	33,9
	IV	59	47,5	81,4
	V	13	10,5	91,4
	Sem informação	10	8,1	100
Total	124	100		
Índice Mitótico	0	6	4,8%	4,8%
	$> 0 < 6$	42	33,9%	38,7%
	≥ 6	57	46%	84,7%
	Sem informações	19	15,3%	100%

Ulceração	Presente	61	49,2	49,2
	Ausente	44	35,5	84,7
	Sem informações	19	15,3	100
	Total	124	100	
Infiltrado Inflamatório Intra- tumoral	Presente	66	53,2	53,2
	Ausente	58	46,8	100
	Total	124	100	
Infiltrado Inflamatório Peritumoral	Presente	85	68,5	68,5
	Ausente	39	31,5	100
	Total	124	100	
Invasão vascular	Presente	24	19,4	19,4
	Ausente	72	58,1	77,5
	Sem informações	28	22,5	100
	Total	124	100	
Invasão Perineural	Presente	10	8,1	8,1
	Ausente	85	68,5	76,6
	Sem informações	29	23,4	100
	Total	124	100	
Regressão	Presente	20	16,1	16,1
	Ausente	104	83,9	100
	Total	124	100	
Satelitose	Presente	9	7,3	7,3
	Ausente	115	92,7	100
	Total	124	100	

6.1.4. Seguimento

Dos 124 pacientes com seguimento, 72 (58,1%) deles permaneceram vivos sem melanoma, 28 (22,5%) vivos com a doença, 10 (8,1%) morreram por conta do melanoma e apenas 2 (1,6%) faleceram por outras causas. Além destes, 12 (9,7%) pacientes não tinham informações quanto ao seu status.

7. DISCUSSÃO

Todos estes dados demonstrados nesta monografia e pesquisados no serviço são de grande importância para dar um prognóstico ao paciente do serviço e também para estudos de sobrevivência, necessários para a melhor elucidação das doenças.

Por ser um centro de referência de saúde pública e também um conceituado centro de pesquisa, seria necessário uma centralização dos dados de seguimentos dos pacientes atendidos na UNIFESP, para assim poder ter uma ligação dentro do próprio serviço, como também com outros serviços. Cada levantamento de caso acarreta uma maior dificuldade, que demanda maior tempo e disponibilidade do pesquisador, dificultando a obtenção de informações indispensáveis ao estudo.

O melanoma é uma patologia que apresenta um lugar de destaque entre as neoplasias, devido ao seu aumento de incidência e da sua progressão acelerada. Atualmente, as informações e esclarecimentos sobre o câncer de pele geral são muito bem veiculados, fazendo com que as pessoas tenham um maior conhecimento, melhorando assim a sobrevivência dos indivíduos acometidos por essa doença.

A maioria dos pacientes do estudo é do sexo feminino, caucasianos e apresentam uma idade média de 57,13 anos, correspondente a média mundial [8] [26].

O tipo histológico de melanoma mais frequente na amostra é do tipo extensivo superficial, conforme já demonstrado na literatura, porém o segundo com maior incidência é do tipo acral lentiginoso, diferindo da literatura que mostra o tipo nodular sendo mais comum do que o acral [8] [26]. Os melanomas acrais-lentiginosos são mais encontrados na população afro-descendente e oriental, o que pode explicar a sua maior frequência nos pacientes atendidos na UNIFESP, que se constituem de uma maioria miscigenada, porém com traços genéticos oriundos de suas etnias de origem [82].

Dentre as variáveis morfológicas dos casos estudados, observa-se a maior profundidade de Breslow encontrada em muitos deles, exemplificada pela maior frequência de melanomas maiores que 4 mm (42,7%). Quanto ao Clark o nível de maior incidência é o IV (47,5%) e o número de mitoses localizadas apresentou uma média de 9 mitoses por cga, além da maioria dos tumores primários serem ulcerados (49,2%). Esses parâmetros revelam um pior prognóstico da amostra do estudo, podendo ser explicado pela procura tardia do serviço de saúde pela população. Corroboram estes dados, o encontro de uma porcentagem alta de

metástases em linfonodos sentinela (37%), muito acima da média mundial (até 22%), fato que ocorre quando o grupo de melanomas tem espessura maior [46].

Devido o alto percentual de metástase encontrada nos linfonodos sentinela, era esperado que houvesse uma grande quantidade de pacientes com metástases em outros locais, assim 31,5% dos casos tiveram um histórico de aparecimento de metástase, sendo que 47,5% destes apresentaram acometimento de vísceras, principalmente em pulmão e cérebro.

A maioria dos pacientes deste estudo permaneceram vivos sem a doença até o último seguimento (58,1%), porém 8,1% faleceram devido ao melanoma e suas conseqüências, com sobrevida média baixa de 27,7 meses. Nesta amostra 85,5% dos pacientes apresentaram sobrevida maior que 3 anos, dentro dos limites demonstrados na literatura [8] [83].

Quando esses fatores são estudados e observam-se as diferenças entre a amostra da UNIFESP comparadas a outros centros nacionais ou até mundiais, não deve ser esquecida a heterogeneidade da população brasileira, que pode levar a essa mudança nas taxas dos parâmetros. Mesmo que o estudo tenha a maior parte de caucasóides, isso não significa que não haja uma mistura de raças, já que no Brasil a etnia é uma característica qualitativa.

Todos estes parâmetros demonstram de forma prática o que já foi colocado neste trabalho, a progressão rápida do melanoma e conseqüentemente a importância do estudo desta patologia.

8. CONCLUSÕES

1. Os pacientes, em sua maioria, eram do sexo feminino com idade média de 57,13 anos e caucasianos.

2. O tipo histológico mais frequente foi o extensivo superficial, seguido do acral lentiginoso.

3. Predominaram casos muito profundos, com espessura de Breslow acima de 4 mm, Clark IV, ulcerados e em média com 9 mitoses por cga, levando ao pior prognóstico desta amostra.

4. Ficou clara a procura tardia destes pacientes pelo serviço médico, sendo demonstrada pelo alto percentual de metástases em linfonodos sentinelas. As metástases viscerais acometeram principalmente pulmões e cérebro.

5. Os pacientes que faleceram devido ao melanoma apresentaram uma sobrevida média de 27,7 meses, comprovando a alta letalidade desta patologia. E 85,5% apresentaram sobrevida maior que 3 anos.

9. CONHECIMENTOS ADQUIRIDOS

Neste tempo de 9 meses o aprendizado acumulado foi de grande relevância, entre os itens passados estão: Levantamento de literatura para estudo, desenho de projeto de pesquisa, estudo de metodologias, levantamento de casos e leitura de Prontuários, análise histológica de casos de Melanoma Cutâneo e aprendizado das Técnicas de Imunoistoquímica e de Hibridização in situ por fluorescência.

10. ATIVIDADES REALIZADAS EM 2011

- *Participação em reunião científica semanal do Departamento de Patologia.*

- *Avaliação Histopatológica dos casos do estudo com o orientador Dr. Gilles Landman.*

- *Participação conjunta no projeto: Melanoma acral-lentiginoso: análise imunoistoquímica da expressão das proteínas PTEN, c-Kit, Ciclina D1, B-RAF, Myc e avaliação por hibridização in situ por fluorescência dos genes PTEN, Myc CCND1, RREB1, MYB e centrômero 6.*

Pós-graduando: Fernando Cintra Lopes (Mestrado)

- *Estágio de curta duração para aprendizado da técnica de FISH no Hospital A.C. Camargo.*

Carga Horária: 32 horas

- *Curso de Patologia Investigativa*

Carga Horária Total: 84 horas – Créditos: 07

- *III Workshop: Skin lesions induced by solar radiation and melanoma: pathophysiology, prevention and therapeutics*

Carga Horária: 12 horas

- *IV Encontro Internacional de Patologia Investigativa e XVI Jornada de Patologia do Hospital A.C. Camargo*

Carga Horária: 31 horas

- *Curso de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos e Animais.*

Carga Horária: 36 horas - Créditos: 03

- *Curso de Tumores do Sistema Digestório*

Carga Horária: 96 horas - Créditos: 08

11. PERSPECTIVAS FUTURAS

Término do trabalho para cumprimento dos objetivos propostos. Posterior redação e submissão de artigo com resultados finais do estudo.

Matricula no programa de pós graduação do Departamento de Patologia da UNIFESP, para realização de projeto de mestrado voltado a biologia molecular do melanoma cutâneo.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Lin, J.Y. and D.E. Fisher, *Melanocyte biology and skin pigmentation*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 843-50.
2. Herlyn, M., et al., *Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation*. Melanoma Res, 2000. **10**(4): p. 303-12.
3. Rizos, H., Becker, T.M., Holland, E.A., *Cell cycle regulation in the melanocyte*. Textbook of melanoma, 2004(In: Thompson JR Morton DL, Kroon BBr, editors.): p. 13-24.
4. Slominski, A., et al., *Molecular pathology of malignant melanoma*. Am J Clin Pathol, 1998. **110**(6): p. 788-94.
5. Instituto Nacional de Câncer, M.d.S., Brasil, *Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2009., 2009.
6. WHO, W.H.O., Pathology and Genetics of Skin Tumors., 2006. **Lyon: IARC PRESS**
7. Netscher, D.T., et al., *Cutaneous Malignancies: Melanoma and Nonmelanoma Types*. Plastic and Reconstructive Surgery, 2011. **127**(3): p. 37e-56e.
8. Ferrari Junior, N.M., et al., *Cutaneous melanoma: descriptive epidemiological study*. Sao Paulo Med J, 2008. **126**(1): p. 41-7.
9. Curtin, J.A., et al., *Distinct sets of genetic alterations in melanoma*. N Engl J Med, 2005. **353**(20): p. 2135-47.
10. Duncan, L.M., *The classification of cutaneous melanoma*. Hematol Oncol Clin North Am, 2009. **23**(3): p. 501-13, ix.
11. Veronese, L.A.M., M. E. A. , *Cr terios anatomopatológicos para melanoma maligno cutâneo: análise qualitativa de sua eficácia e revisão da literatura*. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 2004. **40**(2): p. 99-112.
12. Chamberlain, A. and J. Ng, *Cutaneous melanoma--atypical variants and presentations*. Aust Fam Physician, 2009. **38**(7): p. 476-82.

13. Ivan, D. and V.G. Prieto, *An update on reporting histopathologic prognostic factors in melanoma*. Arch Pathol Lab Med, 2011. **135**(7): p. 825-9.
14. Smoller, B.R., *Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma*. Mod Pathol, 2006. **19 Suppl 2**: p. S34-40.
15. Bae, J.M., H.O. Kim, and Y.M. Park, *Progression from Acral Lentiginous Melanoma in situ to Invasive Acral Lentiginous Melanoma*. Ann Dermatol, 2009. **21**(2): p. 185-8.
16. Stalkup, J.R., I.F. Orengo, and R. Katta, *Controversies in acral lentiginous melanoma*. Dermatol Surg, 2002. **28**(11): p. 1051-9; discussion 1059.
17. Ridgeway, C.A., et al., *Acral lentiginous melanoma*. Arch Surg, 1995. **130**(1): p. 88-92.
18. Reed, J.A. and C.R. Shea, *Lentigo maligna: melanoma in situ on chronically sun-damaged skin*. Arch Pathol Lab Med, 2011. **135**(7): p. 838-41.
19. *Melanoma Molecular Map Project*. <http://www.mmmp.org/> [cited 2011 31.10].
20. Hussein, M.R., *Genetic pathways to melanoma tumorigenesis*. J Clin Pathol, 2004. **57**(8): p. 797-801.
21. Li, G., K. Satyamoorthy, and M. Herlyn, *Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development*. Crit Rev Oral Biol Med, 2002. **13**(1): p. 62-70.
22. Martins, W.K., *Análise do perfil de expressão gênica em melanomas humanos*. Tese de Doutorado - Fundação Antonio Prudente, 2007.
23. Kumar, V.F., N.; Abbas, A. K., *Robbins & Cotran: Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. Elsevier, 2010(8ª ed.): p. 1480.
24. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-72.
25. McGary, E.C., D.C. Lev, and M. Bar-Eli, *Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma*. Cancer Biol Ther, 2002. **1**(5): p. 459-65.

26. Bonfa, R., et al., *Early diagnosis of cutaneous melanoma: an observation in southern Brazil*. *An Bras Dermatol*, 2011. **86**(2): p. 215-21.
27. MacKie, R.M., A. Hauschild, and A.M.M. Eggermont, *Epidemiology of invasive cutaneous melanoma*. *Annals of Oncology*, 2009. **20**(Supplement 6): p. vi1-vi7.
28. Marrett, L.D., H.L. Nguyen, and B.K. Armstrong, *Trends in the incidence of cutaneous malignant melanoma in New South Wales, 1983-1996*. *Int J Cancer*, 2001. **92**(3): p. 457-62.
29. Riker, A.I., N. Zea, and T. Trinh, *The epidemiology, prevention, and detection of melanoma*. *Ochsner J*, 2010. **10**(2): p. 56-65.
30. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. *CA Cancer J Clin*, 2008. **58**(2): p. 71-96.
31. Rigel, D.S., *Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer*. *J Am Acad Dermatol*, 2008. **58**(5 Suppl 2): p. S129-32.
32. De Fabo, E.C., et al., *Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma*. *Cancer Res*, 2004. **64**(18): p. 6372-6.
33. Fears, T.R., et al., *Average midrange ultraviolet radiation flux and time outdoors predict melanoma risk*. *Cancer Res*, 2002. **62**(14): p. 3992-6.
34. Kanzler, M.H. and S. Mraz-Gernhard, *Primary cutaneous malignant melanoma and its precursor lesions: diagnostic and therapeutic overview*. *J Am Acad Dermatol*, 2001. **45**(2): p. 260-76.
35. Soufir, N., et al., *A French CDK4-positive melanoma family with a co-inherited EDNRB mutation*. *J Dermatol Sci*, 2007. **46**(1): p. 61-4.
36. Piris, A., M.C. Mihm, Jr., and L.M. Duncan, *AJCC melanoma staging update: impact on dermatopathology practice and patient management*. *J Cutan Pathol*, 2011. **38**(5): p. 394-400.
37. Rigel, D.S. and R.J. Friedman, *The rationale of the ABCDs of early melanoma*. *J Am Acad Dermatol*, 1993. **29**(6): p. 1060-1.

38. Kittler, H., et al., *Frequency and characteristics of enlarging common melanocytic nevi*. Arch Dermatol, 2000. **136**(3): p. 316-20.
39. Health Resources. <http://www.health-res.com> [cited 2011 31.10].
40. Breslow, A., *Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma*. Ann Surg, 1970. **172**(5): p. 902-8.
41. Morton D.L., D.D.G., Wanek L.A., Foshag L.J., Cochran A.J., *Multivariate analysis of the relationship between survival and the microstage of primary melanoma by Clark level and Breslow thickness*. Cancer, 1993(71): p. 3737-43.
42. Bütter, A., Hui, T., Chapdelaine, J., Beaunoyer, M., Flageole, H., Bouchard, S., *Melanoma in children and use sentinel lymph node biopsy*. J Pediatr Surg, 2005. **40**9: p. 797-800.
43. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. J Clin Oncol, 2009. **27**(36): p. 6199-206.
44. de Sa, B.C., et al., *Proteins involved in pRb and p53 pathways are differentially expressed in thin and thick superficial spreading melanomas*. Melanoma Res, 2009. **19**(3): p. 135-41.
45. Clark, W.H., Jr., et al., *Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression*. J Natl Cancer Inst, 1989. **81**(24): p. 1893-904.
46. Balch, C.M., et al., *Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma*. J Clin Oncol, 2001. **19**(16): p. 3635-48.
47. Trau, H., et al., *Regression in malignant melanoma*. J Am Acad Dermatol, 1983. **8**(3): p. 363-8.
48. Tomas-Mallebrera, L., et al., *[Sentinel lymph node biopsy in patients with melanoma]*. Actas Dermosifiliogr, 2010. **101**(5): p. 428-36.
49. van Kempen, L.C., *5th Canadian Melanoma Conference: research frontiers*. Expert Rev Anticancer Ther, 2011. **11**(6): p. 845-8.

50. Soares de Sá, B.C., *Criação de “tissue array” de melanomas cutâneos extensivos superficiais para estudo imunoistoquímico de fatores ligados à proliferação e apoptose celular*. Tese Mestrado - Fundação Antônio Prudente., 2005: p. 117.
51. MacKie, R.M., A. Hauschild, and A.M. Eggermont, *Epidemiology of invasive cutaneous melanoma*. *Ann Oncol*, 2009. **20 Suppl 6**: p. vi1-7.
52. Haass, N.K., et al., *Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma*. *Pigment Cell Research*, 2005. **18(3)**: p. 150-159.
53. Muto, N.H., *Análise do perfil de expressão gênica de lesões melanocíticas*. Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente, 2007.
54. Tang, A., et al., *E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro*. *J Cell Sci*, 1994. **107 (Pt 4)**: p. 983-92.
55. Haass, N.K., K.S. Smalley, and M. Herlyn, *The role of altered cell-cell communication in melanoma progression*. *J Mol Histol*, 2004. **35(3)**: p. 309-18.
56. Trosko, J.E., et al., *Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell communication*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1028**: p. 192-201.
57. Yamasaki, H. and C.C. Naus, *Role of connexin genes in growth control*. *Carcinogenesis*, 1996. **17(6)**: p. 1199-213.
58. Naus, C.C., *Gap junctions and tumour progression*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2002. **80(2)**: p. 136-41.
59. Hsu, M., et al., *Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression*. *J Cell Sci*, 2000a. **113 (Pt 9)**: p. 1535-42.
60. Hsu, M.Y., et al., *E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors*. *Am J Pathol*, 2000b. **156(5)**: p. 1515-25.
61. Li, G., et al., *Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development*. *Oncogene*, 2001. **20(56)**: p. 8125-35.

62. Pieperhoff, S., et al., *Desmosomal molecules in and out of adhering junctions: normal and diseased States of epidermal, cardiac and mesenchymally derived cells*. *Dermatol Res Pract*, 2010. **2010**: p. 139167.
63. Hanakawa, Y., et al., *Differential effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation*. *J Invest Dermatol*, 2002. **119**(6): p. 1231-6.
64. Ko, M.S. and M.P. Marinkovich, *Role of dermal-epidermal basement membrane zone in skin, cancer, and developmental disorders*. *Dermatol Clin*, 2010. **28**(1): p. 1-16.
65. Colognato, H. and P.D. Yurchenco, *Form and function: the laminin family of heterotrimers*. *Dev Dyn*, 2000. **218**(2): p. 213-34.
66. Ogawa, T., et al., *The short arm of laminin gamma2 chain of laminin-5 (laminin-332) binds syndecan-1 and regulates cellular adhesion and migration by suppressing phosphorylation of integrin beta4 chain*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(5): p. 1621-33.
67. Carter, W.G., et al., *Distinct functions for integrins alpha 3 beta 1 in focal adhesions and alpha 6 beta 4/bullous pemphigoid antigen in a new stable anchoring contact (SAC) of keratinocytes: relation to hemidesmosomes*. *J Cell Biol*, 1990. **111**(6 Pt 2): p. 3141-54.
68. Xia, Y., S.G. Gil, and W.G. Carter, *Anchorage mediated by integrin alpha6beta4 to laminin 5 (epiligrin) regulates tyrosine phosphorylation of a membrane-associated 80-kD protein*. *J Cell Biol*, 1996. **132**(4): p. 727-40.
69. Chung, H., et al., *Keratinocyte-derived laminin-332 promotes adhesion and migration in melanocytes and melanoma*. *J Biol Chem*, 2011.
70. Hirosaki, T., et al., *Laminin-6 is activated by proteolytic processing and regulates cellular adhesion and migration differently from laminin-5*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(51): p. 49287-95.
71. Tanjore, H. and R. Kalluri, *The role of type IV collagen and basement membranes in cancer progression and metastasis*. *Am J Pathol*, 2006. **168**(3): p. 715-7.
72. Lauer, J.L., L.T. Furcht, and G.B. Fields, *Inhibition of melanoma cell binding to type IV collagen by analogs of cell adhesion regulator*. *J Med Chem*, 1997. **40**(19): p. 3077-84.

73. Maeshima, Y., et al., *Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis*. Science, 2002. **295**(5552): p. 140-3.
74. Hamano, Y., et al., *Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin*. Cancer Cell, 2003. **3**(6): p. 589-601.
75. Franzke, C.W., P. Bruckner, and L. Bruckner-Tuderman, *Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4005-8.
76. Qiao, H., et al., *Collagen XVII participates in keratinocyte adhesion to collagen IV, and in p38MAPK-dependent migration and cell signaling*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(9): p. 2288-95.
77. McMillan, J.R., et al., *Hemidesmosomes show abnormal association with the keratin filament network in junctional forms of epidermolysis bullosa*. J Invest Dermatol, 1998. **110**(2): p. 132-7.
78. De Luca, M., et al., *Role of integrins in cell adhesion and polarity in normal keratinocytes and human skin pathologies*. J Dermatol, 1994. **21**(11): p. 821-8.
79. Iozzo, R.V., et al., *The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices*. Biochem J, 1994. **302** (Pt 3): p. 625-39.
80. Murdoch, A.D., et al., *Widespread expression of perlecan proteoglycan in basement membranes and extracellular matrices of human tissues as detected by a novel monoclonal antibody against domain III and by in situ hybridization*. J Histochem Cytochem, 1994. **42**(2): p. 239-49.
81. Oba-Shinjo, S.M., et al., *Melanocyte Transformation Associated with Substrate Adhesion Impediment*. Neoplasia, 2006. **8**(3): p. 231-241.
82. Wu, X.C., et al., *Racial and ethnic variations in incidence and survival of cutaneous melanoma in the United States, 1999-2006*. J Am Acad Dermatol, 2011. **65**(5 Suppl 1): p. S26-37.

83. Chang, A.E., L.H. Karnell, and H.R. Menck, *The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. Cancer*, 1998. **83**(8): p. 1664-78.