



**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, Shafiqhi 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.

CAPÍTULO II – Objetivos

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Descrever os aspectos clínicos, histopatológicos e da evolução clínica dos pacientes com diagnóstico de melanoma, realizar análise imuno-histoquímica dos blocos em parafina utilizando dois marcadores: IMP3 e FOXP3, e avaliar se a presença deles tem correlação com prognóstico nos melanomas primários.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever os casos de melanoma através da análise de prontuário em respeito aos seguintes aspectos: idade, sexo, diâmetro da lesão, evolução para metástase ou óbito, por melanoma ou por outras doenças.

- Revisar lâminas referentes ao diagnóstico anatomopatológico para avaliar os seguintes dados da lesão de melanoma: sub-tipo clínico, Breslow, presença de mitoses, ulceração e regressão histológica.

- Avaliar a presença de positividade dos marcadores imuno-histoquímicos e se eles são marcadores preditores de prognóstico no melanoma primário.

- Avaliar se regressão histológica se associou a pior prognóstico nos casos estudados.

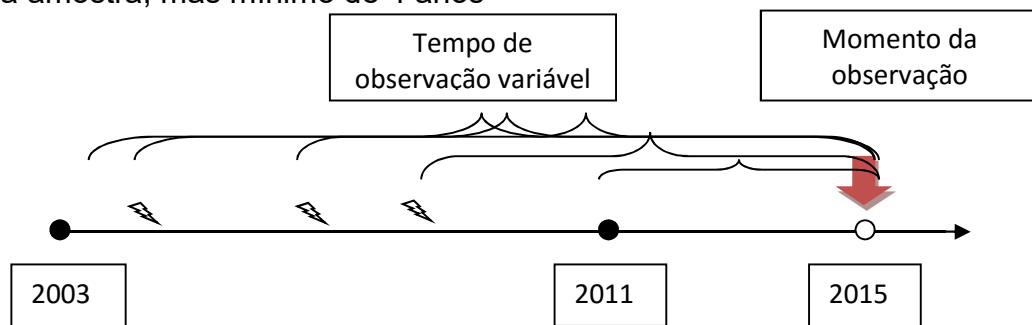
CAPÍTULO III – Métodos

4. Materiais e métodos

4.1. Descrição da amostra e Tipo de estudo

A amostra foi obtida a partir do total de lesões com diagnóstico de Melanoma provenientes do serviço de Dermatologia e Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (UNESP) do período de 2003 a 2011 (9 anos). A partir da amostra foi realizado estudo de Coorte retrospectiva, cujo tempo de observação foi de pelo menos 4 anos (figura 1).

Figura 1. Demonstração do tempo de observação variável da amostra, mas mínimo de 4 anos



4.2. Seleção dos sujeitos

4.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos 195 casos de pacientes provenientes do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, que

tiveram seu diagnóstico anatomopatológico através de peça cirúrgica entre os anos de 2003 e 2011.

4.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos:

1. Pacientes cuja análise do melanoma ocorreu em consulta, e não realizaram nenhum acompanhamento no serviço, ou que iniciaram acompanhamento e perderam seguimento (n=56).
2. Melanomas em que houve dificuldade na classificação em relação ao subtipo histopatológico (n=3).
3. Blocos de parafina que não apresentavam condições técnicas para realização de análise imuno-histoquímica (n=17).
4. Casos que não apresentavam todas as informações necessárias à análise estatística (n=7).

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, a amostra resultou em 112 casos.

4.3.1. Variáveis clínicas

Foram extraídas a partir de prontuário médico

Sexo, idade, tempo entre o surgimento da lesão e diagnóstico, localização, diâmetro, evolução para metástases, óbito por melanoma ou outras doenças.

Todas as metástases foram consideradas como um mesmo desfecho, sendo locais ou distantes. No anexo 1 (gráfico), observamos o detalhamento das metástases nos casos estudados.

4.3.2 Variáveis histopatológicas

Foram extraídas a partir de revisão das lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE)

Subtipo histopatológico, Breslow, ulceração, mitoses, regressão histológica.

4.4 Coleta dos dados

Uma vez identificadas e separadas as cópias dos laudos anatomopatológicos emitidos por médicos patologistas do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – (UNESP) foram avaliados os prontuários em papel e eletrônico de todos os pacientes acompanhados no serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu –

(UNESP). As lâminas e respectivos blocos de parafina encontravam-se arquivados no serviço, e foram retirados do arquivo para realização deste estudo.

4.5 Processamento de dados

4.5.1 Avaliação do prontuário

Foram analisados dados epidemiológicos como sexo e idade. As informações sobre diâmetro das lesões foram obtidas a partir dos pedidos de exame anatomopatológico. Já os aspectos evolutivos, como metástases, óbito por melanoma ou outras doenças foi observado nos dados referentes aos atendimentos realizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

4.5.2. Critérios histopatológicos

As lâminas dos espécimes anatomopatológicos estavam previamente fixadas e coradas pelos métodos de HE, seguindo protocolo do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Este material foi avaliado por dois patologistas (J.C.C.X.Jr.e M.E.A.M) e um dermatologista (J.P.O) para identificar o subtipo histopatológico, avaliar a presença de mitoses, ulceração e regressão histológica, bem como aferir o Breslow.

4.5.3. Técnica de Imuno-histoquímica

A técnica de realização de imuno-histoquímica seguiu protocolo da Instituição UNESP – Botucatu:

Preparação das amostras:

1) As amostras incluídas em parafina foram seccionadas com navalhas de aço inox na espessura de 3 micra em micrótomo rotativo.

2) Os cortes das amostras foram estendidos em lâminas histológicas de vidro, foscas de bordas esmerilhadas, previamente tratadas com organo-silano.

3) Após permanecerem por 18 horas em estufa a 58o C, os cortes passaram pelo processo de desparafinização em xilol e em seguida pelo etanol absoluto seguindo para hidratação.

Recuperação Antigênica:

Recuperação antigênica pelo calor em equipamento PT-LINK (Dako), solução de pH alto por 20 minutos após atingir a temperatura de 95oC.

Reação de imuno-histoquímica automatizada realizada em equipamento Dako Link 48.

1) Bloqueio da peroxidase endógena através da incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 5 minutos em temperatura ambiente.

2) Lavagem em solução Salina Tamponada.

3) Incubação dos anticorpos FOXP3 (Abcam) na diluição de 1:100 e MMP3 (Dako) na diluição de 1:100 por 30 minutos.

4) Lavagem em solução Salina Tamponada.

5) Incubação do anticorpo conjugado (secundário e terciário) Labelled Polymer Flex/HRP por 10 minutos em temperatura ambiente.

6) Lavagem em solução Salina Tamponada.

7) Revelação pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB – DAKO) por 5 minutos.

8) Lavagem em solução Salina Tamponada.

9) Contra Coloração em Hematoxilina (Dako) por 10 minutos.

9.1) Após a análise de algumas lâminas, foi trocada a contra-coloração para Giemsa

10) Lavagem em água destilada.

11) Desidratação em etanol absoluto e xilol.

12) Montagem com lamínulas em resina sintética.

4.5.4. Análise da imuno-histoquímica

Foram observados novamente pelos 2 patologistas e 1 dermatologista em microscópio multiobservacional para que, em análise manual, determinassem em concordância, a porcentagem de células coradas pelos marcadores. Foi considerado denominador o total de células (melanócitos ou linfócitos) de toda a lesão, e realizada estratificação conforme tabela 1.

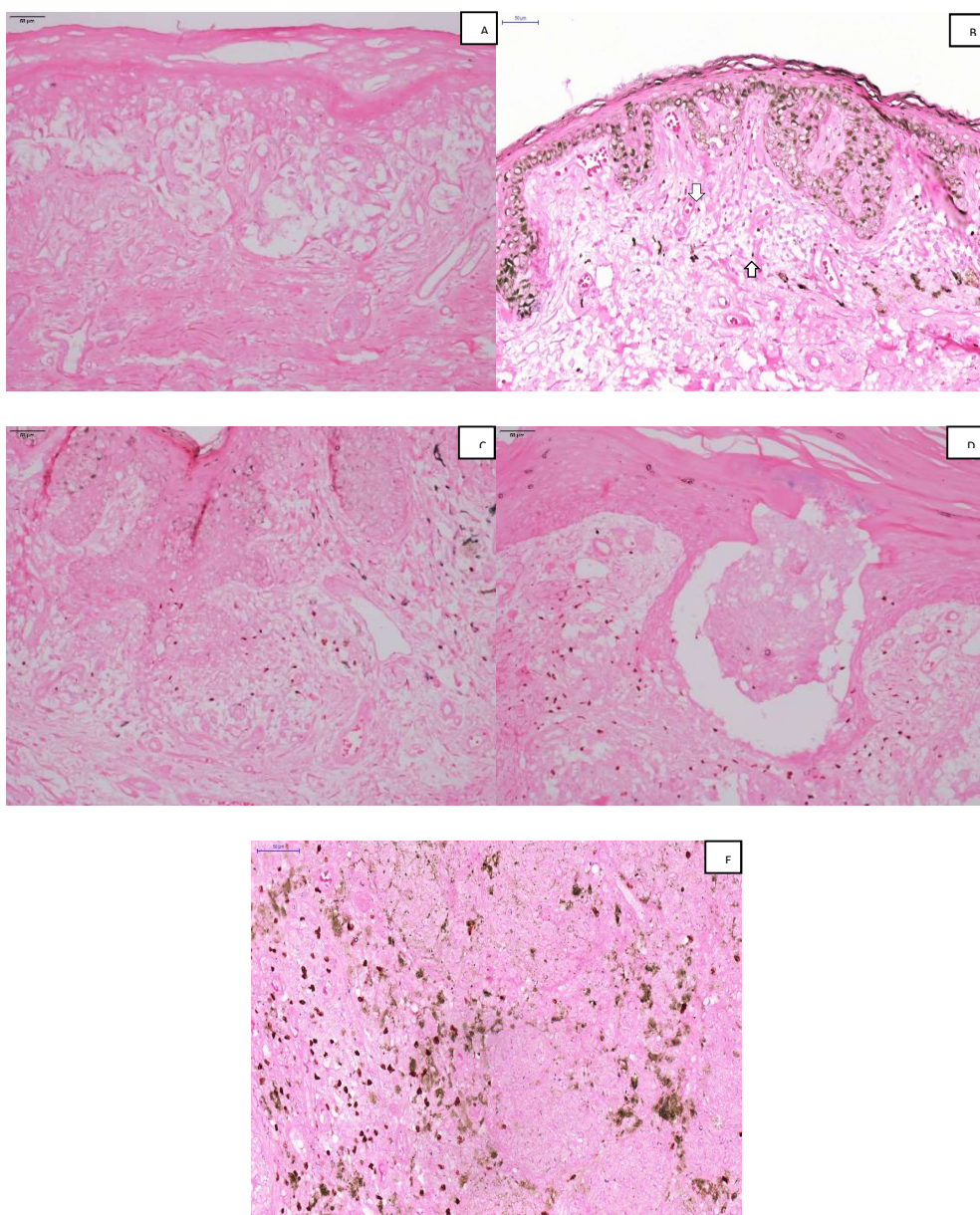
Tabela 1 . Estratificação da porcentagem de células coradas pelo imunomarcador e graduação com sistema de “cruzes”

Porcentagem (%)	Graduação em “cruzes”
0	0
0-5%	†
6-25%	††
26-50%	†††
51-100%	††††

A seguir, figuras 1 a 5 evidenciando a positividade dos imunomarcadores.

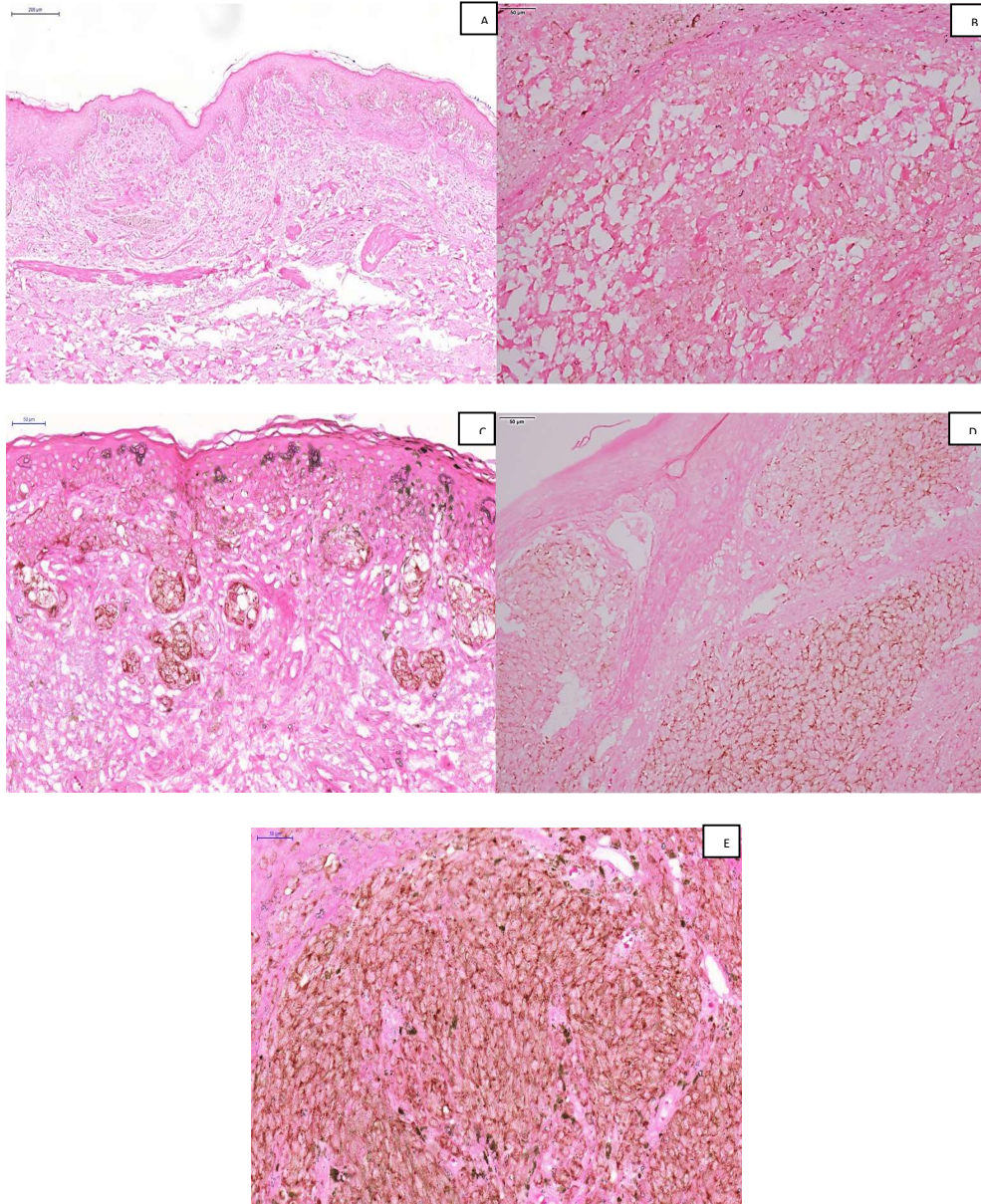
FOXP3

Figura 1. Lâmina com demonstração da positividade do marcador FOXP3, apresentando marcação negativa na primeira figura (a), 1+ (b), 2+(c), 3+ (d) e 4+ (e) respectivamente. Contra-coloração em Giemsa, aumento de 400x.



IMP3

Figura 2. Lâmina com demonstração da positividade do marcador IMP3, apresentando marcação negativa na primeira figura (a), 1+ (b), 2+(c), 3+ (d) e 4+ (e) respectivamente. Contra-coloração em Giemsa, aumento de 400x.



4.6 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística e a testes paramétricos e não paramétricos, tais como Qui-Quadrado ou Exato de Fisher, Kruskall-Wallis, Dunn e Modelo de regressão de Cox. Foram considerados valores positivos quando IC95% ou $p < 0,05$.

4.7 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, processo 33405714.1.0000.5411/2014 (vide Anexo 4).

4.8 Aspectos financeiros

O projeto teve apoio da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo 2014/16031-5.

CAPÍTULO IV– Artigos científicos

Artigo 1. Ocanha JP, Xavier-Jr JCC, Marques MEA. Diferenças clínicas e histopatológicas entre os subtipos de melanoma: série de 136 casos. Será submetido aos Anais Brasileiros de Dermatologia.

Artigo 2. Ocanha JP, Xavier-Jr JCC, Nunes HRC, Marques MEA. Positivity of IMP3 e FOXP3: Impact on prognosis in melanoma's subtypes. Será submetido ao American Journal of Dermatopathology.

Título: Diferenças clínicas e histopatológicas entre os subtipos de melanoma: série de 136 casos

Autores: Juliana Polizel Ocanha^a, MD (jpocanha@gmail.com)

José Cândido C. Xavier-Júnior, MD, PhD^b (josecandidojr@yahoo.com.br)

Mariângela Esther Alencar Marques, MD, PhD^b (mmarques@fmb.unesp.br)

a – Departamento de Dermatologia e Radioterapia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu-SP, Brasil.

b - Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu-SP, Brasil.

Autor Correspondente:

Juliana Polizel Ocanha, MD
Departamento de Dermatologia e Radioterapia,
Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Distrito de Rubião Júnior, s/n
CEP: 18618-970
Botucatu-SP, Brasil.
Telefone: + 55 (14) 991710436
Email: jpocanha@gmail.com

Palavras-chave: melanoma, dermatopatologia, prognóstico, taxas de sobrevida, neoplasia metastática.

Conflito de interesse: Nada a declarar

Suporte financeiro: Fapesp:16013-5/2014

Resumo

Fundamentos: O melanoma vem aumentando em incidência no Brasil e no mundo, e à despeito nas melhorias no diagnóstico e tratamento a mortalidade vem se mantendo estável.

Objetivos: Traçar um perfil clínico e histopatológico dos pacientes do serviço, bem como correlacionar estes dados com a evolução clínica.

Métodos: Estudo de coorte retrospectiva que analisou todos os pacientes diagnosticados com melanoma do período de 2003 a 2011, com seguimento clínico de pelo menos 4 anos. Foram avaliados prontuários e lâminas armazenadas em arquivo. A comparação entre os subtipos histológicos realizou-se através de teste de Qui-Quadrado, exato de Fisher, Kruskal-Wallis e teste de Dunn. P valor abaixo de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados: Não houve diferença estatística entre os grupos com relação à idade. O Breslow foi significativamente menor no subtipo extensivo superficial (ES) do que nos subtipos acral (Ac) e nodular (Nd). O subtipo nodular apresentou maior número de mitoses que ES e lentigo maligno (LM). ES apresentou menos ulceração e metástases que Ac e Nd. Regressão foi mais presente nos subtipos ES e LM. Nos pacientes que permaneceram na amostra, só houveram mortes por melanoma no grupo Ac.

Limitações: Utilização do prontuário como fonte de dados

Conclusões: Subtipo ES apresenta indicadores de melhor prognóstico: menor Breslow que Ac e Nd, menos ulceração e metástases. Regressão histológica é mais presente nos subtipos ES e LM. Nd exibe mais mitoses que ES e LM.

Introdução

Nos Estados Unidos, entre 1992 e 2014, os casos de melanoma aumentaram em frequência em torno de 1,4% ao ano (de 15 casos/ 100000 habitantes para 21,6 / 100.000). Além disso, o número de mortes por melanoma é da ordem de 2,7 / 100 mil por ano, o que representa 1,7% de todas as mortes por câncer. Quando está confinado à epiderme (“in situ”), os pacientes com melanoma apresentam sobrevida em 5 anos de cerca de 98,3%; no entanto, quando metastático, a taxa de sobrevivência em 5 anos é inferior a 18%. Identifica-se que as taxas de mortalidade permanecem estáveis, apesar de uma melhoria no diagnóstico e busca de novos enfoques terapêuticos.¹

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima 5670 casos novos de melanoma para 2016 (INCA, 2016).² Segundo Nasser (2011), em estudo epidemiológico realizado no sul do país, observou-se aumento na incidência e na mortalidade por melanoma nos últimos 30 anos. Além disso, foi identificada maior frequência dessa neoplasia entre as mulheres, após os 50 anos, sendo o tronco o sítio mais acometido.³

Desde 1969, os casos de melanoma têm sido agrupados em quatro diferentes subtipos clínicos e patológicos: extensivo superficial (ES), lentigo maligno (LM), lentiginoso acral (Ac) e nodular (Nd); que são a base para a classificação da Organização Mundial de Saúde;⁴ sendo ES o subtipo mais frequente (cerca de 60%).⁵

Após a incorporação da medida do Breslow, índice mitótico e ulceração como marcadores de pior prognóstico pelo *American Joint Cancer Committee* (AJCC), a importância da classificação em subtipos histológicos tornou-se questionável. Por outro lado, a identificação de mutações genéticas em subtipos específicos tem retomado a importância da classificação histológica para decisão terapêutica dos casos.⁵

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar possível associação entre: variáveis clínicas, evolutivas e histopatológicas para os diferentes subtipos de melanoma, apresentando dados que poderão servir de referência para orientação quanto ao seguimento e organização das políticas públicas acerca do melanoma em nosso país.

Métodos

Trata-se de estudo de coorte retrospectiva, no qual foi realizada análise confidencial do banco de dados de todos os casos de melanoma submetidos à exérese cirúrgica na Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP – Botucatu – SP) no período de primeiro de janeiro de 2003 a 31 de dezembro de 2011. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina – UNESP / Botucatu – SP (CAAE 33405714.1.0000.5411/2014).

Dados do prontuário foram a fonte para dados clínicos e demográficos (idade, sítio de acometimento, diâmetro em centímetros, tempo até o diagnóstico, metástase, morte relacionada com melanoma e

morte por outras causas). As lâminas foram submetidas à segunda análise realizada por dois patologistas (MEAM e JCCXJr) e por uma dermatologista (JPO) para complementar todas as informações histológicas acerca da lesão primária. Foram analisados: Breslow, presença de ulceração, mitoses e regressão histológica.

Foram excluídos os pacientes que interromperam o seguimento e aqueles que não apresentavam classificação quanto ao subtipo histológico. As variáveis do local da lesão e tempo desde o diagnóstico não puderam ser avaliadas devido à dificuldade de se estabelecer o sítio primário adequados nos casos de Ac e porque os pacientes com ES não conseguiam determinar o tempo exato desde o início da primeira lesão.

Os dados foram submetidos à análise estatística com utilização do *software* SPSS versão 21.0. Comparação entre os subtipos histológicos foram realizadas através de testes de Qui-Quadrado, exato de Fisher, Kruskal-Wallis e teste de Dunn. P valor abaixo de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

De um total de 195 pacientes diagnosticados com melanoma nos 9 anos do estudo (2003 – 2011) permaneceram 136 pacientes após serem aplicados os critérios de exclusão. Foram identificados 67 casos em homens (49,3%) e 69 em mulheres (50,7%); com média de idade de 57 anos. Considerando os subtipos histológicos, o subtipo mais comum foi o

ES (n=85; 62,5%), seguido pelo Ac (n= 21; 15,5%), Nd (n= 17; 12,5%) e LM (n=13; 9,5%). (Figura 1)

A média de idade entre os grupos foi: ES = 58 anos, Ac = 62 anos e Nd = 59 anos e LM = 70 anos. (Tabela 1)

Houve também uma diferença entre os subtipos histológicos acerca do diâmetro e metástases ($p < 0,001$). Nos casos de ES a mediana do diâmetro foi de 1,0 cm contra 2,3 e 2,0 cm nos subtipos Ac e Nd, respectivamente. A presença de metástases foi significativamente menor em ES (9,4%) que nos subtipos Ac e Nd (50,0% e 70,6%) Mortes relacionadas ao melanoma foram maiores no grupo de Ac (15%). Não houve mortes por melanoma nos demais subtipos de melanoma. Além disso, cinco pacientes morreram por outras doenças: 1 paciente do grupo do ES, 2 pacientes do grupo do Ac, 2 pacientes do grupo do LM. (Tabela 1)

Breslow, ulceração, mitoses e regressão também foram diferentes entre os grupos ($p < 0,001$). A mediana do Breslow foi de 0,5 mm para ES, contra 2,0 e 4,6 mm para Ac e Nd. Ulceração foi menos frequente no grupo ES. Além disso, o subtipo Nd exibiu maior taxa de mitoses (5 mitoses / mm^2) que os subtipos ES e LM.

Observou-se que frequência de regressão histológica foi mais elevada nos casos de ES (58,2%) e LM (69,2%) que nos casos de Ac (20,0%) e Nd (12,5%). (Tabela 2)

Discussão

O principal resultado desse estudo foi a identificação de características clínico-histopatológicas distintas para os diferentes subtipos de melanoma numa população do interior do Brasil.

Em pacientes caucasianos, o subtipo mais frequente é o ES. Esse subtipo apresentou menor Breslow, menor diâmetro, menor número de mitoses, ulceração, metástase e frequência de mortes por melanoma; dados em conformidade com a literatura⁵, justificando o melhor prognóstico desse subtipo. Além disso, ES e LM apresentaram maiores taxas de regressão.

Lentigo maligno melanoma é o subtipo histológico mais frequentemente correlacionado à exposição solar.^{6,7} Em semelhança aos casos de ES, eles apresentaram elevadas taxas de regressão histológica. Considerando a idade dos pacientes e o crescimento tumoral lento, além da dificuldade quanto à exérese completa desses tumores devido a difícil avaliação clínica das margens cirúrgicas, tratamentos conservadores no caso de LM podem ser sugeridos.⁸ Entretanto, neste grupo foram identificados 13 pacientes (9.5%), sendo que quatro casos (30,8%) apresentaram metástases, em acordo com as estimativas mais elevadas,⁹ apesar da ausência de mortes por melanoma.

Melanoma lentiginoso acral é mais comum na população não-caucasiana,¹⁰ ocorrendo geralmente em locais não expostos ao sol. Em

conformidade estudos anteriores e com a descendência africana da população brasileira, o subtipo Ac apresentou número considerável de pacientes. ¹¹Os casos de Ac apresentaram, em comparação aos casos do subtipo ES, menores taxas de regressão e maior frequência de óbitos por melanoma (15%).

A literatura é controversa quanto a agressividade do Ac ou se há atraso no diagnóstico desse subtipo histológico devido ao local em que ele ocorre. No entanto, identifica-se para os casos de Ac sobrevida de 5 anos menor em relação aos demais subtipos histológicos (80,3% e 91,3%; respectivamente).¹²

Melanoma nodular apresenta frequência aproximada entre 10% e 30%, havendo altas taxas de autodiagnóstico devido à história clínica de crescimento rápido¹³. Barbe et al (2012) demonstraram média de Breslow de 2.02 mm de Breslow,¹⁴ consideravelmente inferior aos 4.6mm identificados nesta população podendo caracterizar provável atraso no diagnóstico. No entanto, apesar da associação do subtipo nodular com metástases linfonodais,¹⁵ estas não resultaram em aumento na frequência de mortes por melanoma.

Como limitações do estudo destacamos que o prontuário foi a fonte de dados utilizando casos com mínimo de 4 anos de seguimento. Além disso, a população estudada requer estudos futuros para consolidar os resultados.

Dessa forma, esse estudo demonstrou que o subtipo extensivo superficial se apresenta com características melhores acerca do prognóstico em relação aos subtipos acral e nodular. Os subtipos extensivo superficial e lentigo maligno apresentam maior prevalência de regressão. Nesse contexto, os achados reafirmam a importância da definição do subtipo histológico como fator prognóstico, influenciando a forma de abordagem e segmento desses pacientes.

Agradecimentos

Hélio R.C. Nunes pela análise estatística.

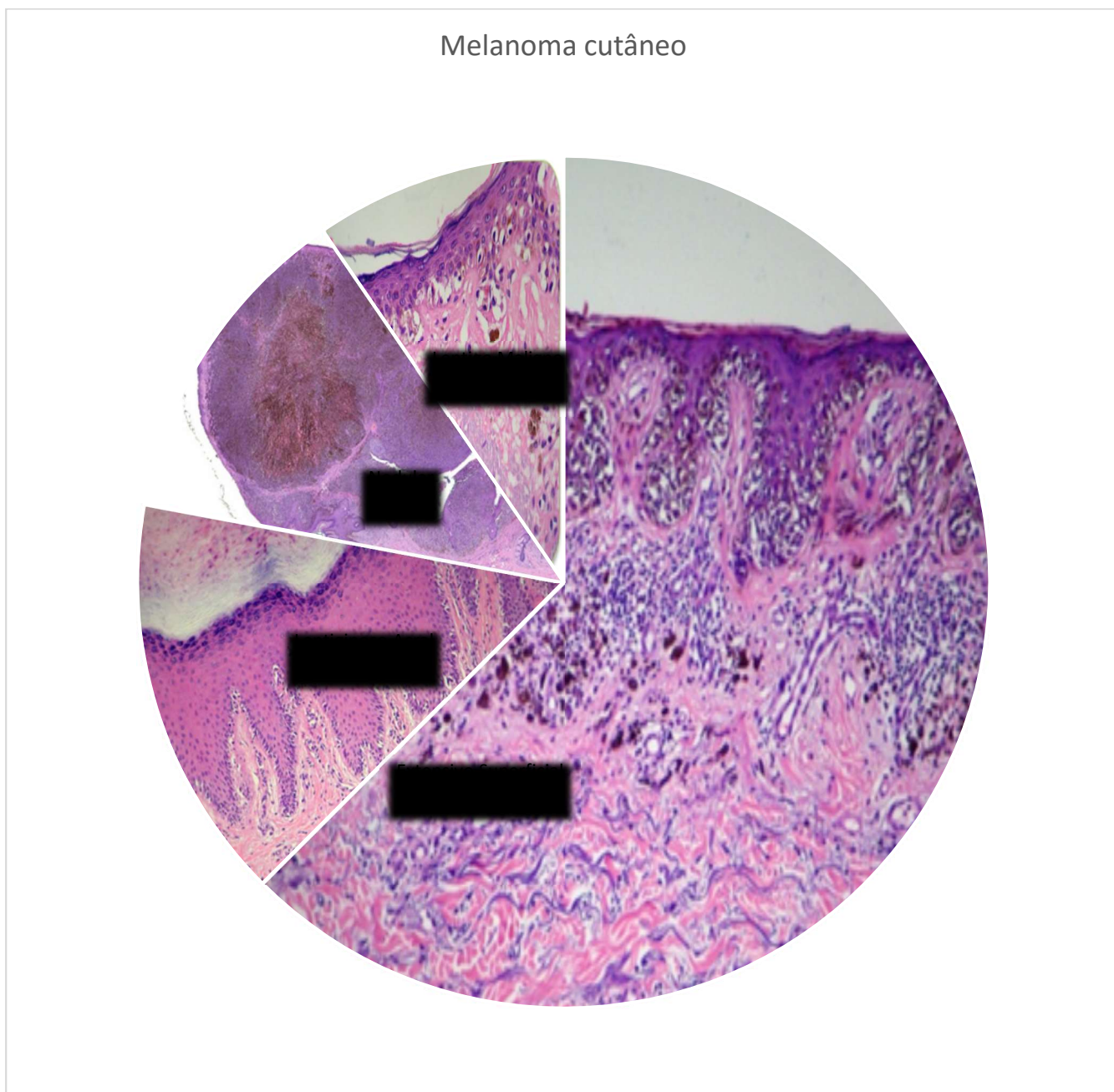
Referências

1. 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/. Acessado 18 de Maio de 2015.
2. 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>
3. Naser N. Cutaneous melanoma: a 30-year-long epidemiological study conducted in a city in southern Brazil, from 1980-2009. *An Bras Dermatol*. 2011; 86:932-41.
4. de Vries E, Bray F, Coebergh JW, Cerroni L, Ruiters 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.
5. 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.
6. Gorman M, Hart A, Mathew B. A Left-Sided Prevalence of Lentigo Maligna: A UK Based Observational Study and Review of the Evidence. *Dermatol Res Pract*. 2015; 2015:1-6.

7. 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.
8. Weinstock MA, Sober AJ. The risk of progression of lentigo maligna to lentigo maligna melanoma. *Br J Dermatol.* 1987; 116:303–10.
9. Kasprzak JM, Xu YG. Diagnosis and management of lentigo maligna: a review. *Drugs Context.* 2015; 4:1-16.
10. Phan A, Touzet S, Dalle S, Ronger-Savlé S, Balme B, Thomas L. Acral lentiginous melanoma: histopathological prognostic features of 121 cases. *Br J Dermatol.* 2007; 157:311-318.
11. Möhrle M, Lichte V, Breuninger H. Operative therapy of acral melanomas. *Hautarzt.* 2011; 62:362-367.
12. Albreski D, Sloan SB. Melanoma of the feet: misdiagnosed and misunderstood. *Clin Dermatol.* 2009; 27:556-563.
13. 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.
14. Barbe C, Hibon E, Vitry F, Le Clainche A, Grange F. Clinical and pathological characteristics of melanoma: a population-based study in a French regional population. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012; 26:159-164.

15. Cadili A, Dabbs K. Predictors of sentinel lymph node metastasis in melanoma. *Can J Surg.* 2010; 53:32-36.

Figura 1. Distribuição dos subtipos histológicos na população estudada. Fotos de lâminas em Hematoxilina-Eosina.



Tabelas:

Tabela 1. Comparação entre os subtipos de melanoma cutâneo, em relação aos aspectos clínicos

Variáveis	Subtipo				Valor de p ^{1,2}
	Extensivo Superficial	Lentiginoso Acral	Nodular	Lentigo Maligno	
Idade ¹	58,0 (22,0-83,0)	59,0 (29,0-88,0)	59,0 (29,0 - 88,0)	70,0 (41,0 - 81,0)	p=0,05 ¹
Diâmetro ¹	1,0 (0,1-5,0) a	2,3 (0,5 - 6,0) bc	2,0 (1,0 - 6,5) bc	1,5 (0,5 - 15,0) ac	p<0,001 ¹
Metástases ²	8/85 (9,4%) a	10/20 (50,0%) bc	12/17 (70,6%) bd	4/13 (30,8%) acd	p<0,001 ²
Óbito por outras causas ²	1/85 (1,2%) a	2/20 (10,0%) ab	0/17 (0,0%) ab	2/13 (15,4%) b	p=0,025 ²
Óbito por melanoma ²	0/85 (0,0%) a	3/20 (15,0%) b	0/17 (0,0%) ab	0/13 (0,0%) ab	p=0,005 ²

(1) Teste de Kruskal Wallis seguido por teste de Dunn para comparações múltiplas. Dados em mediana (mínimo-máximo). Letras iguais indicam similaridade entre os grupos.

(2) Teste de Qui-Quadrado ou teste de Exato de Fisher. Dados em média. Letras iguais indicam similaridade entre os grupos.

Tabela 2. Comparação entre os subtipos de melanoma cutâneo, em relação aos aspectos histopatológicos

Variáveis	Subtipo				Valor de p ^{1,2}
	Extensivo Superficial	Lentiginoso Acral	Nodular	Lentigo Maligno	
Breslow ¹	0,5 (0,0 - 10,0) a	2,0 (0,0 - 25,0) bc	4,6 (1,1 - 20,0) bc	0,7 (0,0 - 8,0) ac	p<0,001 ¹
Mitoses ¹	0,0 (0,0 - 21,0) a	2,0 (0,0 - 50,0) ab	5,0 (1,0 - 44,0) b	0,0 (0,0 - 15,0) a	p<0,001 ¹
Ulceração ²	11/79 (13,9%) a	13/20 (65,0%) bc	11/16 (68,8%) bc	5/13 (38,5%) ac	p<0,001 ²
Regressão Histológica ²	46/79 (58,2%) a	4/20 (20,0%) b	2/16 (12,5%) b	9/13 (69,2%) a	p<0,001 ²

(1) Teste de Kruskal Wallis seguido por teste de Dunn para comparações múltiplas. Dados em mediana (mínimo-máximo). Letras iguais indicam similaridade entre os grupos.

(2) Teste de Qui-Quadrado ou teste de Exato de Fisher. Dados em média. Letras iguais indicam similaridade entre os grupos.

2. Artigo 2

Title: Positivity of IMP3 and FOXP3: Impact on prognosis in melanoma's subtypes

Authors: Juliana Polizel Ocanha^a, MD (jpocanha@gmail.com)

José Cândido C. Xavier-Júnior, MD, PhD^b (josecandidojr@yahoo.com.br)

Mariângela Esther Alencar Marques, MD, PhD^c (mmarques@fmb.unesp.br)

a - Dermatology and Radiotherapy Department, Paulista State University (UNESP), Botucatu, Brazil. Rubião Junior District s/n ZIP code 18618-970. Botucatu – SP / Brazil

b – Private Clinic. Araçatuba – SP / Brazil

c- Pathology Department, Paulista State University (UNESP), Botucatu, Brazil. Rubião Junior District s/n ZIP code 18618-970. Botucatu – SP / Brazil

Corresponding author:

Juliana Polizel Ocanha, MD
Department of Dermatology and Radiotherapy
Botucatu Medical School - Paulista State University (UNESP)
Rubião Junior District, (without number)
ZIP code 18618-970.
City: Botucatu / State: São Paulo / Country: Brazil
Telephone: + 55 (18)981367050
Email: jpocanha@gmail.com
FUNDING DISCLOSURE: Fapesp (Governmental):16013-5

ABSTRACT

BACKGROUND: In spite of improvements in diagnosis and treatment, melanoma still has considerable mortality. The incapability to predict with more precision its evolution continues to urge specialists. **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 analyzed 112 patients diagnosed with Melanoma in the period of 2003 to 2011, from Botucatu Medical School (UNESP). Samples were reanalyzed by two pathologists and one dermatologist to ensure histological subtype, Breslow, presence of ulceration, mitosis and histological regression. From the species stored, FOXP3 and IMP3 immunohistochemistry staining were performed. Besides that, a records study was executed in order to evaluate demographic, clinical and evolution aspects of the patients. Qui-square, Fisher's Exact test, Dunn's Test and Cox Regression analysis were used. It was considered statistically significant when p value <0,05. **RESULTS:** The majority of cases had 25% or less positivity of both IMP3 and FOXP3. Their positivity could not be related to occurrence of metastasis (p= 0,947 and p=0,936, respectively). **CONCLUSION:** There is no evidence of benefit in the use of IMP3 or FOXP3 as prognosis markers in primary melanomas in our population.

KEY WORDS: melanoma; dermatopathology; prognosis; survival rate;

neoplasm metastasis

Introduction

In the United States, frequency of melanoma has been raising from 15 to 21.6 cases per 100000 habitants which represents 1,4% raise a year. Unfortunately, mortality numbers remain stable. When it's confined to epidermis ("in situ"), the survival in 5 years is near to 98,3% but, when it's metastatic, that survival is below 18%.¹ Therefore, as melanoma is a potentially curable lesion in the initial steps, the early diagnosis is required.

Since 1969, melanoma was divided in four clinical and histopathological subtypes: Superficial Spreading (SS), Lentigo Maligna (LM), Acral (Ac) and Nodular (Nd).² The discovery of genetic mutations that are preferred in some clinical subtypes^{3,4}, reinforced them as distinct entities.

The incapability to fully predict the tendency to develop melanoma metastasis is the main barrier to the development of more efficient treatments.⁵ Despite the improvement in follow up and treatment, there are cases which skip the rules: thin melanomas with aggressive metastasis and thick lesions with long survival free from disease.⁵

Recently an immunohistochemistry marker named IMP-3 (Insulin-like growth factor-II messenger RNA (mRNA)-binding protein-3) was described. It is expressed by embryonic tissues and some neoplasms. In melanocytes it sets out as an immunostaining in cytoplasm. Most studies say it is more positive in malignant and metastatic lesions.^{5,6,7,8}

Another subject of interest in melanomas is the host immune response. One of melanoma's escape mechanisms could be the expression of FOXP3 (Forkhead transcription factor), which is also expressed by regulatory T cells (CD4+CD25^{high}). Its main function is to inhibit response of CD8 cells, which are responsible for host defense against tumor. It is mainly a nuclear marker of CD4+CD25^{high} lymphocytes.⁹

The purpose of this study is to evaluate IMP3 and FOXP3 expression in melanoma subtypes and to correlate this presence with metastasis. This method is less expensive than molecular analysis and it would be a useful prognostic marker leading to a better patients' follow-up and treatment.

Methods

All patients diagnosed with Melanoma from Dermatology and Pathology services from Botucatu Medicine School – Paulista State University (UNESP) during the period of 2003 to 2011 were included in the study.

The study was approved by Institutional Review Board approval (Registration number: 33405714.1.0000.5411/2014) and informed consent was dispensed.

This retrospective cohort study analyzed records looking for epidemiologic and clinical variables: gender, age, diameter, evolution to metastasis, death by melanoma or by other diseases. A review from the

samples stained in Hematoxilin and Eosin was made to verify: histological subtype, Breslow, presence of ulceration, mitosis and histological regression, by the agreement of one dermatopathologist (MEAM), one surgical pathologist (JCCXJr) and one dermatologist (JPO) in multihead microscope.

The species fixed in paraffin and stored in archives were submitted to IMP3 and FOXP3 immunohistochemistry staining.

Patients who have lost follow-up (n= 56), those whose data were incomplete (n=7), cases of unclassified melanoma (n=3), cases which histological specimen was not available or it was not enough for new immunohistochemistry slides (n= 17) were excluded.

Immunohistochemistry technique

The samples were submitted to Botucatu Medical School's protocol.

Preparing the samples: all samples fixed in paraffin were cut in slices of 3 micrometers thickness. The sections were placed in glass laminas previously treated. After standing for 18 hours in incubator at 58 celsius degrees they were deparaffinized with xylol and hydrated with ethanol.

Antigenic recovering: Through heat, in the equipment PT-LINK, high pH solution for 20 minutes after reaching 95 celsius degrees.

Automatized immunohistochemistry technique, realized in

equipment Dako Link 48 (does not include rinsing with buffered saline water between each step): Endogenous peroxidase blocking (3% H₂O₂ for 5 minutes at 25 celsius degrees). Incubation of the antibodies 1:100 diluted FOXP3 (Abcam) and 1:100 diluted IMP3 (Dako) for 30 minutes. Incubation of the conjugated antibodies (secondary and tertiary) Labelled Polymer Flex/HRP for 10 minutes at 25 celsius degrees. Exposure through chromogen 3,3-diaminobenzidine (DAB – DAKO) for 5 minutes. First, Hematoxilin was used as contra-staining but after it was switched to Giemsa, with the purpose of better discrimination between IMP3 and melanin.

Immunohistochemistry analysis

Since there is no consensus about immunohistochemistry score in IMP3 and FOXP3, we have established a stratification system which was applied for both markers. Those patients that had no cells marked in immunohistochemistry were graduated in 0, followed by 0 to 5% of positive cells (1+), 6 to 25% (2+), 26 to 50% (3+) and 50 to 100% positivity were graduated in 4+. Cases scored 2+ or more were considered “positive” for immunohistochemistry analysis.

Statistical analysis

Data was submitted to parametrical and non-parametrical tests such as Qui-square and Fisher’s Exact Test, Kruskall Wallis, Dunn’s test and Cox’s regression analysis. It was considered statistically significant when CI was > 95% or when p value was < 0,05.

Results

All patients with melanoma diagnosed between the years of 2003 and 2011 were 195 in total. After applying excluding criteria, 112 patients were submitted to IMP-3 and FOX P3 immunohistochemistry (Figures 1 and 2). All metastasis, local or distant were considered as the same denouement event.

In this sample, 47,3% of the patients were females (Table 1) what have not been associated with metastasis ($p=0,495$) (Table 2). Age after 61,5 years old was associated to metastasis, comparing to the younger group ($p=0,032$). ROC's curve was applied in order to obtain age's cut off.

Subtypes frequency was similar to previously described in literature (Table 1) but Acral group has a higher frequency comparing to Caucasian studies, reflecting a higher presence of black and Asian population in our country. Our sample had thin Breslow, low frequency of mitosis, ulceration and evolution to metastasis and death (Table 1) which represents probably a high number of early diagnosed lesions.

Nodular subtype was the one which had more association with metastasis ($OR=9$), but all subtypes had greater risk in comparison with superficial spreading.

Breslow, ulceration and mitosis were associated to metastasis. The OR for 1 to 4 mm of Breslow was 8,33 and for Breslow > 4

mm the OR was 14,44 ($p < 0,001$). (Table 2) When there were more than 5 mitosis the OR was 15,65 against 13,44 when there were few mitosis. Presence of ulceration was related to metastasis with a OR of 5,44, $p < 0,001$.

Almost half of the patients showed histological regression (49,1%) (Table 1). Regression was inversely associated to metastasis (OR=0,36, $p = 0,021$).

The majority of cases had 25% or less positivity of both IMP3 and FOXP3. (Table 1 and 2). Their positivity could not be related to metastasis ($p = 0,947$ and $p = 0,936$, respectively), even when cut off number was changed. Because the number of deaths was very low (3 deaths) it was not possible to analyze this event.

Discussion

The main finding of that study was the usefulness of immunostaining of IMP3 and FOXP3 to predict melanoma metastasis in all subtypes in the studied sample.

IMP3 works in post transcriptional modulation of oncogenes related to cell proliferation, metastasis, chemotherapy resistance and survival.¹¹ There are few studies of the use of IMP3 immunostaining in melanoma, and mainly it was considered positive if present in at least 10% of melanocytes by direct observation.^{7,8} It was demonstrated to be negative in common and dysplastic nevi, weak positivity in thin melanomas and Spitz nevi and strong positivity in metastatic melanomas.^{6,7} Some authors have

suggested a worse prognosis in IMP3 positive cancers ⁸ and Mentrikoski et al.⁹ have suggested its use to discriminate benign nevi inside lymph nodes of metastasis.

Nevertheless, Chokoeva et al. ¹² have shown positivity in only 40% of melanomas and 20% of dysplastic nevi, suggesting it is a weak prognostic marker. In our study approximately 10% of the melanomas had more than 25% positivity, and this positivity was present in also 11% (3/27) of the melanomas that developed metastasis, which means near 89% (24/27) metastatic melanomas had less than 25% positivity. Our study did not show correlation between IMP3 and metastasis ($p=0,947$), what has been confirmed by another statistical analysis considering 6% as the cutoff for IMP3 positivity value.

FOXP3 is a transcription factor that is produced by melanoma cells and is present in regulator T cells (CD4+CD25+). It is implied in many mechanisms of inhibiting effective T Cells (CD8+), declining the main defense against tumor. ¹³

Several studies in animals indicate positive correlation between CD4+CD25+FOXP3+ cells presence and tumor progression. Murine melanomas had a delay in time to visible lesion, decrease in tumor's weight and increase in survival time when FOXP3 was inhibited. ¹⁴Its inhibition raises vaccination against tumor-associated antigens efficiency. ¹⁵

Positivity of FOXP3 cells was associated with faster

progression and a high number of metastasis to sentinel lymph node, ¹⁶ but also correlated with a better response to immunotherapy^{17,18,19}. Ipilimumab, an anti CTL4 immunotherapy agent have depleted CD4+CD25+FOXP3+ cells ^{20,21}.

However, Ladányi et al. ²² and Hillen et al. ²³ have not associated FOXP3 presence to worse prognosis. This study did not show its correlation with metastasis (p=0,936). By the way, those studies analyzed the primary lesion, as our study did. FOXP3 could have a better use by analyzing metastasis instead of primary lesions.

The main limitation of our study was low frequency of denouement events, mainly death. Therefore, the study collected all possible patients in our service in a period of nine years, with minimum follow-up of 4 years and a maximum of 12 years which represents a good portrait of our population.

In conclusion, there was no evidence of benefit in the use of IMP3 or FOXP3 as prognosis markers in primary melanomas in our population. Clinical and pathological features as mitoses, Breslow, ulceration and histological subtype were associated with metastasis in accordance to previous studies. Regression was inversely associated with metastasis. More researches are needed in order to reinforce those statements. Pathologists and dermatologists could be cautious before accomplishing new prognostic markers in their routine.

References

1. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012. [database online] Bethesda, MD: National Cancer Institute. Available at: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/. Updated November 18, 2015.
2. 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.
3. Mazurenko NN, Tsyganova IV, Lushnikova AA, et al. Spectrum of oncogene mutations is different in melanoma subtypes. *Mol Biol (Mosk)*. 2015; 49:1022-1029.
4. Slipicevic A, Herlyn M. KIT in melanoma: many shades of gray. *J Invest Dermatol*. 2015; 135:337-338.
5. Albreski D, Sloan SB. Melanoma of the feet: misdiagnosed and misunderstood. *Clin Dermatol*. 2009; 27:556-563.
6. Yu L, Xu H, Wasco MJ, et al. IMP-3 expression in melanocytic lesions. *J Cutan Pathol*. 2010; 37:316-322.
7. Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA et al. IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Modern Pathol*. 2008; 21:431-437.
8. Sheen YA, Liao YH, Ming-Hsien 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.
9. Mentrikoski MJ, Ma L, Pryor JG et al. Diagnostic utility of IMP3 in segregating metastatic melanoma from benign nevi in lymph nodes. *Mod Pathol.* 2009; 22:1582-1587.
 10. Niu J, Jiang C, Li C et al. Foxp3 expression in melanoma cells as a possible mechanism of resistance to immune destruction. *Cancer Immunol Immunother.* 2011; 60:1109–1118.
 11. Lederer M, Bley N, Schleifer C, Hüttelmaier S. The role of the onco-fetal IGF2 mRNA-binding protein 3 (IGF2BP3) in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2014; 29:3-12.
 12. 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.
 13. Ustun C, Miller JS, Munn DH, Weisdorf DJ, Blazar BR Regulatory T cells in acute myelogenous leukemia: is it time for immunomodulation? *Blood.* 2011; 118:5084-5095.
 14. 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.

15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Feng Z, Puri S, Moudgil T, Wood W, Hoyt CC, Wang C et al. Multi-spectral imaging of formalin-fixed tissue predicts ability to generate tumor-infiltrating lymphocytes from melanoma. *Journal for Immunotherapy of Cancer.* 2015; 3:47.
19. 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.

20. 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.
21. 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.
22. Ladányi A, Mohos A, Somlai B, Liskay G, Gilde K, Fejos 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.
23. Hillen F, Baeten CI, van de Winkel A, Creytens 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.

Figure 1. Positivity to FOX P3, score zero (a), 1+ (b), 2+ (c), 3+ (d) and 4+ (e).
Contra-colored by Giemsa, 400x.

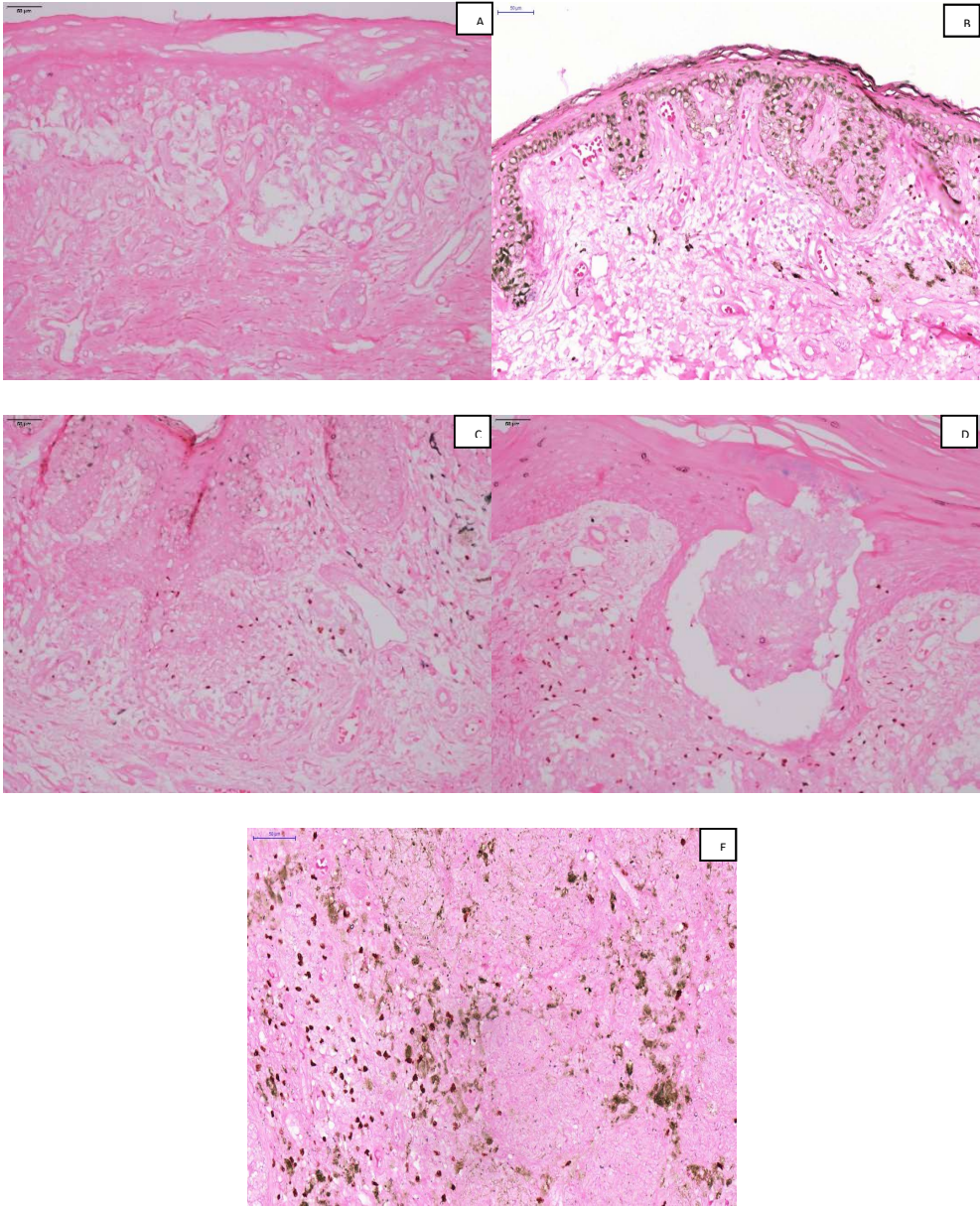


Figure 2. Positivity to IMP3, score zero (a), 1+ (b), 2+ (c), 3+ (d) and 4+ (e).
Contra-colored by Giemsa, 400x.

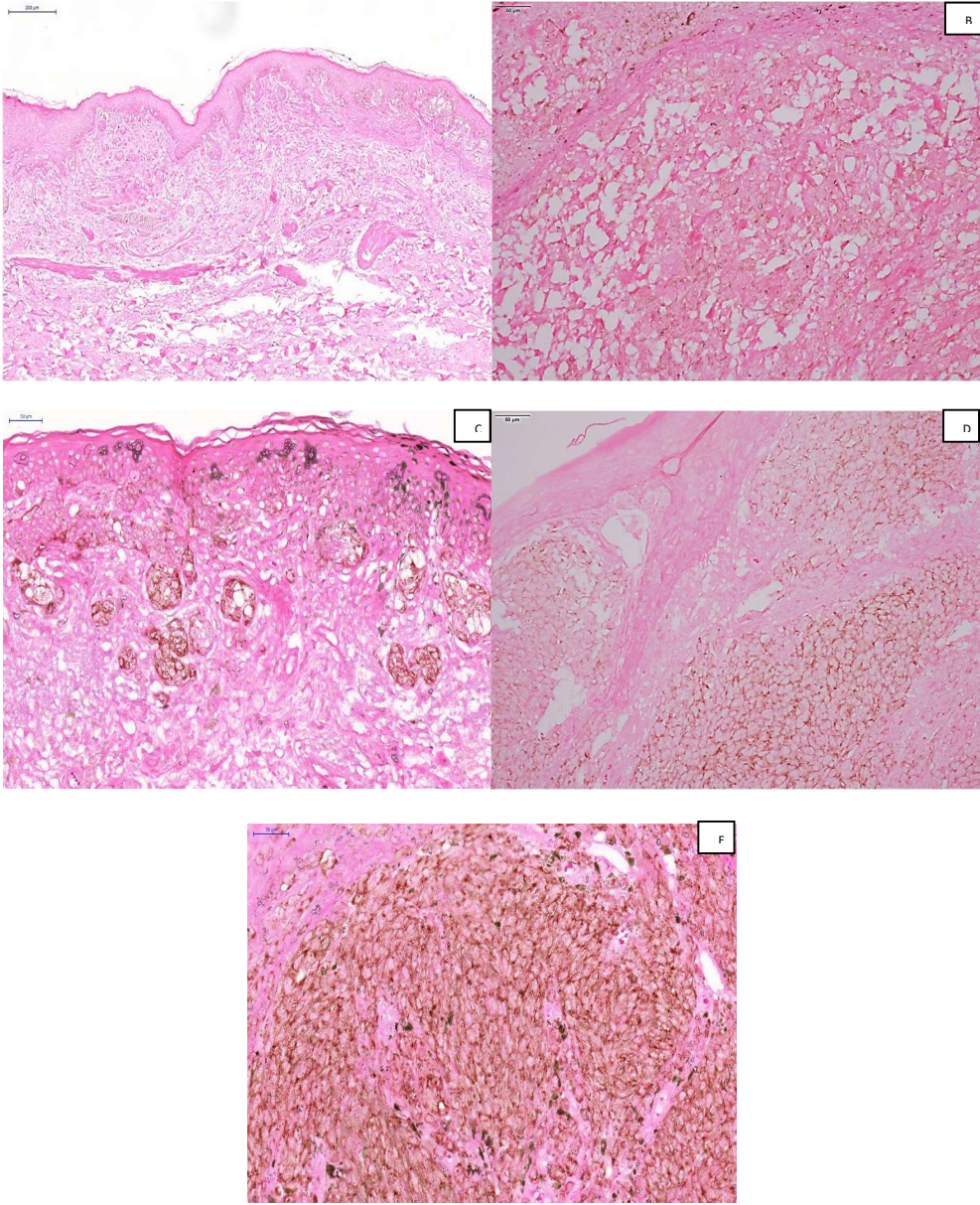


Table 1 - Sample's profile (n=112)

Varies	n	%
Gender		
Female	53	47,3
Male	59	52,7
Age (years)		
	59(22-92)	
Subtype		
Superficial Spreading	72	64,3
Acral Lentiginous	17	15,2
Nodular	12	10,7
Lentigo maligna	11	9,8
Breslow		
	0.70 (0.0 - 25.0)	
Number of mitosis		
	0(0-50)	
Ulceration		
No	78	69,6
Yes	34	30,4
IMP3		
0	83	74,1
1+	6	5,4
2+	11	9,8
3+	7	6,3
4+	5	4,5
FoxP3		
	7	6,3
1+	33	29,5
2+	59	52,7
3+	12	10,7
4+	1	0,9
Regression		
No	57	50,9
Yes	55	49,1
Metastasis		
No	85	75,9
Yes	27	24,1
Death		
No	109	97,3
Yes	3	2,7
Numeric summary - median (min-max)		

Table 2 – Metastasis' risk related to clinical and histopathological variables.

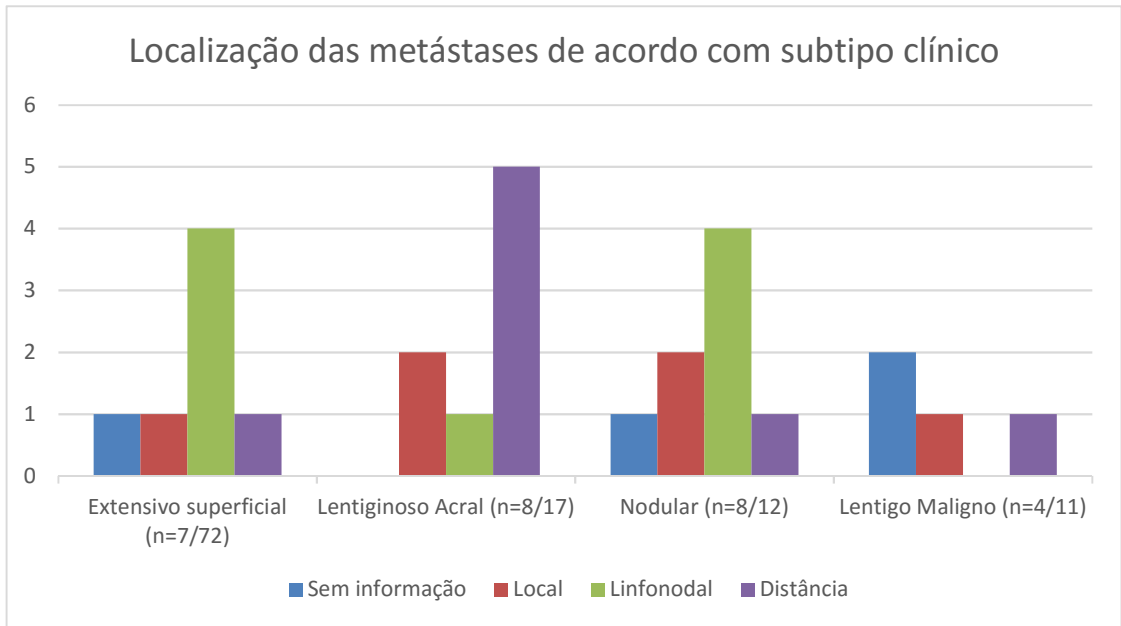
Variables		Without metastasis	With metastasis	OR (CI95%)	<i>p</i>
Gender	Female	42(79%)	11(21%)	1.00	
	Male	43(73%)	16(27%)	1.30 (0.60 – 2.81)	0.495
Age*	≤ 61.5	55(85%)	10(15%)	1.00	
	> 61.5	30(64%)	17(36%)	2.35 (1.07 – 5.13)	0.032
Subtype	SS	66(92%)	6(8%)	1.00	
	Ac	9(53%)	8(47%)	5.65 (1,95 – 16.27)	0.001
	Nd	3(25%)	9(75%)	9.00 (3.20 – 25.28)	< 0.001
	LM	7(64%)	4(36%)	4.36 (1.23 – 15.46)	0.022
Breslow*	[0 a 1]	62(95%)	3(5%)	1.00	
	(1 a 4]	16(62%)	10(38%)	8.33 (2.29 – 30.27)	0.001
	> 4	7(33%)	14(67%)	14.44 (4.15 – 50.26)	< 0.001
Ulceration	Absence	70(90%)	8(10%)	1.00	
	Presence	15(44%)	19(56%)	5.44 (2.38 – 12.44)	< 0.001
Mitosis*	0	58(97%)	2(3%)	1.00	
	[1 a 5]	16(55%)	13(45%)	13.44 (3.03 – 59.59)	0.001
	> 5	11(48%)	12(52%)	15.65 (3.50 – 69.93)	0.001
IMP3*	≤ 2+	76(76%)	24(24%)	1.00	
	> 2 +	9(75%)	3(25%)	1.04 (0.31 – 3.45)	0.947
FOXP3*	≤ 2+	75(76%)	24(24%)	1.00	
	> 2 +	10(77%)	3(23%)	0.95 (0.28 – 3.16)	0.936
Regression	Absence	37(65%)	20(35%)	1.00	
	Presence	48(87%)	7(12%)	0.36 (0.15 – 0.85)	0.021

Cox's Regression model.

CAPÍTULO V – Conclusão

- Frequência semelhante de melanoma entre os sexos.
- Idade superior a 61,5 anos se correlacionou mais a metástases que o grupo mais jovem.
- Todos os subtipos foram mais associados a metástase que ES.
- Breslow, ulceração e mitoses foram associados a metástases.
- Regressão foi inversamente associada à presença de metástases.
- A maioria de casos teve positividade menor que 25% para IMP3 e para FOXP3.
- A minoria dos casos metastáticos foi positiva para IMP3 e FOXP3.
- A positividade IMP3 e FOXP3 não pode ser correlacionada a metástases.
- **Não há evidência de benefício do uso de IMP3 ou FOXP3 como marcadores prognósticos em melanoma primários na nossa população.**

Anexo 1. Gráfico demonstrando a distribuição das metástases nos casos estudados (n=27).



Anexo 2 – Tabela 1 – Modelo final ajustado para o risco de metástase em função das variáveis clínicas e histopatológicas mais fortemente associadas ($p < 0.05$) na fase bivariada.

	β	ep	Wald	p	RR (IC95%)
Breslow (Ref=[0a1])					1.00
(1 a 4]	1.29	0.75	2.92	0.088	3.62 (0.83 – 15.81)
> 4	1.66	0.74	4.94	0.026	5.23 (1.22 – 22.54)
Mitoses (Ref=0)			4.05	0.132	
[1 a 5]	1.73	0.86	4.05	0.044	5.63 (1.05 – 30.31)
> 5	1.60	0.90	3.18	0.075	4.96 (0.85 – 28.82)

Seleção Backward com critério de saída $p < 0.10$. Modelo final obtido em 5 passos

Anexo 3 - Tabela 2 – Associação entre subtipo e IMP3, FOXP3

	Subtipo				p
	Esup (n=72)	Ac (n=17)	Nod (n=12)	LM (n=11)	
IMP3 ≥ 1+	15(21%)	3(18%)	5(42%)	6(55%)	0,056
FOXP3 ≥ 1+	70(97%)	14(82%)	12(100%)	9(82%)	

Teste exato de Fisher



FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FOXP3 E IMP3: IMPACTO NA EVOLUÇÃO DOS DIFERENTES SUBTIPOS CLÍNICOS DE MELANOMA CUTÂNEO

Pesquisador: JULIANA POLZEL OCANHA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 33405714.1.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 737.540

Data da Relatoria: 04/08/2014

Apresentação do Projeto:

O melanoma corresponde a 4% dos cânceres de pele. Sua incidência no Brasil foi em torno de 6230 casos novos para o ano de 2012, o que entretanto revelou um crescimento em relação aos anos anteriores. Este aumento é 15 vezes mais rápido do que qualquer outra malignidade.

Trata-se de um tumor menos frequente, porém até um quinto dos pacientes desenvolve metástases, geralmente relacionadas à morte, em indivíduos mais jovens em relação a outros cânceres. São necessários mais estudos para avaliar a necessidade da utilização dos marcadores imunohistoquímicos, pesando-se também o custo adicional da inserção de múltiplos marcadores em relação ao ganho em diagnóstico e para o paciente.

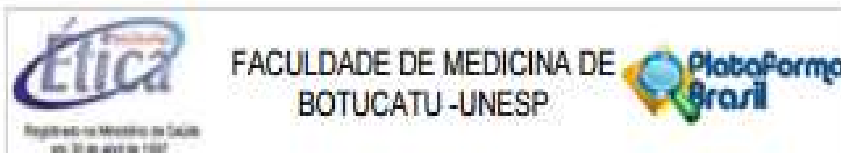
FOXP3 é um marcador de células T reguladoras.

IMP3 é uma proteína de ligação do RNA mensageiro do IGF2, descrita no melanoma.

Objetivo: O objetivo deste trabalho será comparar diversos tipos clínicos de melanoma em relação a expressão de marcadores imunohistoquímicos (FOXP3 e IMP3) e correlacionar com prognóstico e sobrevida.

Material e métodos: Trata-se de um estudo observacional analítico a partir de material anatomopatológico de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os sujeitos do estudo serão todos os pacientes operados com diagnóstico de Melanoma do período de 2003 a 2008. A casuística deste período é de cerca de 89 pacientes. A relação entre

Endereço: Chácara Sulquelli, s/n
Bairro: Rubião Junior CEP: 16.018-970
UF: SP Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3883-1638 E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 737.561

positividade para os marcadores imunohistoquímicos e subtipo clínico, evolução e sobrevida será analisada através de medidas de associação entre variáveis quantitativas e qualitativas.

Trata-se de estudo que visa obtenção de título acadêmico (mestrado) da Dra. Juliana Ocarina, orientado pela Profa. Mariângela Marques, do Depto de Patologia da Unesp.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar diversos tipos clínicos de melanoma em relação a expressão de marcadores imuno-histoquímicos (FOXP3 e IMP3) e correlacionar com prognóstico e sobrevida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos específicos ligados à pesquisa.

Os benefícios se associam à potencial contribuição dos resultados para a ciência.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo com braço transversal que avaliará 89 melanomas e correlacionará aspectos fenotípicos com características clínico-histológicas. O braço longitudinal avaliará a sobrevida em 5 anos dos pacientes, e investigará a associação de aspectos fenotípicos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos as autorizações estão apresentadas.

Os pesquisadores apresentam solicitação de dispensa do TCLE devido ao único manuseio de material parafinado e os registros de prontuário, sem identificação dos sujeitos.

O estudo foi orçado em R\$76.536,71, e será submetido à FAPESP.

Recomendações:

Não foi estimado o percentual de óbitos (mortalidade específica) desses pacientes, o que dificulta a avaliação de adequação do tamanho amostral.

Não foram definidos como critérios de exclusão os melanomas in situ, que, conceitualmente, não implicam em mortalidade.

Não foram explicitados os modelos de análise dos dados. Provavelmente, modelos de sobrevivência multivariados (Cox-Mantel).

Como o estudo será iniciado em 2015, a inclusão de pacientes do ano de 2009 seria estratégica para aumentar a representatividade da amostra.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugiro aprovação sem envio ao CONEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Ciências Biológicas, s/n
Bairro: Rubião Junior CEP: 16.018-970
UF: SP Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1628 E-mail: capebio@fmb.unesp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Contribuição do Financiador: 737.540

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa APROVADO, deliberado em reunião do CEP de 04 de agosto de 2014, sem necessidade de envio à CONEP.

Solicitamos aos pesquisadores que apresentem ao CEP, o respectivo "Relatório Final de Atividades" ao final do estudo.

RECOMENDAÇÃO DO CEP: Não foi estimado o percentual de óbitos (mortalidade específica) desses pacientes, o que dificulta a avaliação de adequação do tamanho amostral.

Não foram definidos como critérios de exclusão os melanomas in situ, que, conceitualmente, não implicam em mortalidade.

Não foram explicitados os modelos de análise dos dados. Provavelmente, modelos de sobrevivência multivariados (Cox-Mantel).

Como o estudo será iniciado em 2015, a inclusão de pacientes do ano de 2009 seria estratégica para aumentar a representatividade da amostra.

OBS: Qualquer documento que os pesquisadores desejarem postar na PB para esclarecimentos dessas recomendações deverá ser feita na forma de "NOTIFICAÇÃO" nesta conta.

BOTUCATU, 04 de Agosto de 2014

Assinado por:

SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Itaipavali, s/n

Bairro: Rubião Júnior

CEP: 16.018-970

UF: SP Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1808

E-mail: cep@fmb.unesp.br

