

Cristina Alessi

**MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS AO MICROAMBIENTE LINFONODAL
NOS MELANOMAS COM E SEM METÁSTASE**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação da Fundação Pio XII - Hospital de
Câncer de Barretos para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Vinicius de Lima Vazquez

Barretos, SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

A372m Alessi, Cristina.

Marcadores moleculares relacionados ao microambiente linfonodal nos
melanomas com e sem metástase/ Cristina Alessi. - Barretos, SP 2016.
80 f. : il.

Orientador: Dr. Vinicius de Lima Vazquez

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII –
Hospital de Câncer de Barretos, 2016.

1. Melanoma cutâneo. 2. Linfonodo sentinela. 3. PD1. 4. VEGF C. 5. VEGF
A. 6. PDL1. I. Autor. II. Vazquez, Vinicius de. III. Título.

CDD 616.994

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cristina Alessi da Rocha

Marcadores moleculares relacionados ao microambiente linfonodal nos melanomas com e sem metástase.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 27/06/2016

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cristovam Scapulatempo Neto
Instituição: Clínicas Oncológicas Integradas (COI)

Profa. Dra. Patricia Abrão Possik
Instituição: Instituto Nacional de Câncer (INCA)

Prof. Dr. Vinicius de Lima Vazquez
Orientador e Presidente da Banca

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) através de Auxílio à Pesquisa – Regular (processo número 447590/2014-6)

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão do CNPQ.

“Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos”.

“Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos”.

“Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo”.

À Deus, por mais essa conquista e por estar sempre presente na minha vida.

Ao meu pai, por me ensinar a amar e respeitar a
pesquisa científica.

Ao meu marido, pela paciência e apoio
incondicional.

À minha família e aos amigos, por tornarem
meus dias mais leves.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Vinicius de Lima Vazquez, meu orientador e professor, agradeço pelo companheirismo e seriedade com que exerce seu trabalho. Agradeço pela receptividade, pela dedicação e pela paciência que teve durante o desenvolvimento de todo o nosso projeto.

Ao Prof. Dr Cristiano Ribeiro Viana, pela competência, clareza e objetividade com que contribuiu com o projeto, além da disponibilidade e boa vontade em ajudar, prestativo e participativo em todas as etapas.

Ao prof. Dr Cristovam Scapulatempo Neto, além de patologista da pesquisa, agradeço pelas avaliações nas bancas de acompanhamento, sempre prestativo, atento aos detalhes e boa vontade em ajudar e colaborar na pesquisa.

Ao Guilherme Gomes Ribeiro e funcionários da patologia, por confeccionarem minhas lâminas com rapidez e objetividade, agradeço pela boa vontade em me atender e ensinar.

Ao Núcleo de Apoio ao pesquisador, em especial ao Cleyton pelo suporte estatístico e esclarecimentos fundamentais à confecção da dissertação.

Aos funcionários da Biblioteca, à Milene G. Marques pela rapidez em me enviar os artigos solicitados, sempre prestativa e amigável e ao Martins Fideles dos Santos Neto, agradeço pelas aulas de EndNote e pela companheirismo frente aos desafios que surgiram na confecção da dissertação.

Aos funcionários do SAME, agradeço pela agilidade no levantamento de prontuários sempre que solicitados.

À secretaria da pós-graduação, Brenda Honda Moraes, Silvana Rodrigues e Simone Nogueira pelos avisos das aulas, lembretes de datas, agradeço por estarem sempre atentas aos passos da pesquisa, palavras amistosas e conselhos.

Aos funcionários do Comitê de ética em pesquisa (CEP) pelos esclarecimentos e auxílio durante a submissão e manutenção do projeto ao comitê de ética em pesquisa.

“O homem é do tamanho do seu sonho”.

Fernando Pessoa

SUMÁRIO:

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Introdução e epidemiologia	1
1.2	Classificação e estadiamento	2
1.3	Fatores de risco	7
1.4	Diagnóstico e tratamento	7
1.4.1	Tratamento da lesão primária	8
1.4.2	Pesquisa do linfonodo sentinela e tratamento das metástases linfonodais	8
1.4.3	Tratamento da doença disseminada	11
1.5	Marcadores moleculares e o microambiente linfonodal	13
2	OBJETIVOS	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Ética na pesquisa	19
3.2	Desenho do estudo	19
3.3	Critérios de inclusão	19
3.4	Critérios de exclusão	19
3.5	População de estudo	19
3.6	Confecção das lâminas de imuno-histoquímica	20
3.7	Análise das lâminas	21
3.8	Análise estatística	22
4	RESULTADOS	23
4.1	População de estudo	23
4.2	Características dos linfonodos estudados	26
4.3	Frequência de imunoexpressão dos marcadores	27
4.4	Deteção da imunoexpressão	34
4.5	Análise de sobrevida global e sobrevida livre de doença	37

4.6	Sobrevida global e livre de doença de acordo com a imunorreação com os marcadores de interesse	46
4.6.1	PD1	46
4.6.2	VEGF C	49
4.6.3	VEGF A	52
4.6.4	PDL-1	55
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXOS	
	Anexo A – Carta de aprovação do CEP	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagem representativa de coloração imuno-histoquímica para detecção de PD1 em linfonodo sentinela positivo na periferia do tumor. Magnificação original = 400 vezes.	34
Figura 2	Imagem representativa de coloração imuno-histoquímica para detecção de PD1 em linfonodo sentinela negativo com centro germinativo expressando células T. Magnificação original = 100 vezes.	35
Figura 3	Imagem representativa de coloração imuno-histoquímica para detecção de PDL1 em linfonodo sentinela positivo, imunomarcação no citoplasma das células tumorais. Magnificação original = 200 vezes.	35
Figura 4	Imagem representativa de coloração imuno-histoquímica para detecção de VEGF-C em linfonodo sentinela positivo, imunomarcação na membrana das células tumorais. Magnificação original = 40 vezes.	36
Figura 5	Imagem representativa de coloração imuno-histoquímica para detecção de VEGF-A em linfonodo sentinela positivo, imunomarcação na membrana e citoplasma das células tumorais. Magnificação original = 100 vezes.	36
Figura 6	Curva de sobrevida global do grupo de 103 pacientes portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa do linfonodo sentinela do Hospital de Câncer de Barretos.	37
Figura 7	Curva de sobrevida livre de doença do grupo de 103 pacientes portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa do linfonodo sentinela do Hospital de Câncer de Barretos.	38

Figura 8	Curva de sobrevida específica por melanoma do grupo de 103 pacientes portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa do linfonodo sentinela do Hospital de Câncer de Barretos.	39
Figura 9	Curva de sobrevida global de acordo com a presença de metástases linfonodais em portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa do linfonodo sentinela do Hospital de Câncer de Barretos.	40
Figura 10	Curva de sobrevida livre de doença de acordo com a presença de metástases linfonodais em portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa do linfonodo sentinela do Hospital de Câncer de Barretos.	41
Figura 11	Curva de sobrevida global de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para PD1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	47
Figura 12	Curva de sobrevida livre de doença de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para PD1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	48
Figura 13	Curva de tempo de sobrevida livre de doença específica por melanoma de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para PD1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	49
Figura 14	Curva de sobrevida global de acordo com a imunoexpressão	

	linfonodal (linfonodo sentinela) para VEGF-C em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	50
Figura 15	Curva de sobrevida livre de doença de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para VEGF-C em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	51
Figura 16	Curva de tempo de sobrevida livre de doença específica por melanoma de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para VEGF-C em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	52
Figura 17	Curva de sobrevida global de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para VEGF-A em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	53
Figura 18	Curva de sobrevida livre de doença de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para VEGF-A em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	54
Figura 19	Curva de tempo de sobrevida livre de doença específica por melanoma de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para VEGF-A em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	55
Figura 20	Curva de tempo de sobrevida global de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para PDL1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	56

Figura 21 Curva de tempo de sobrevida livre de doença de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para PDL1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

57

Figura 22 Curva de tempo de sobrevida específica por melanoma de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para PDL1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação da espessura de Breslow com a sobrevida livre de doença em cinco anos.	4
Tabela 2	Classificação do tumor primário, segundo a AJCC – 2009 – melanoma cutâneo.	5
Tabela 3	Avaliação da metástase linfonodal, segundo a AJCC – 2009 – melanoma cutâneo.	5
Tabela 4	Avaliação da metástase à distância, segundo a AJCC – 2009 – melanoma cutâneo.	6
Tabela 5	Estadiamento clínico, segundo a AJCC – 2009 – melanoma cutâneo.	6
Tabela 6	Orientação da margem cirúrgica de acordo com a medida de Breslow.	8
Tabela 7	Características demográficas dos 103 portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela no Hospital de Câncer de Barretos.	23
Tabela 8	Características clínicas, histopatológicas e relacionadas ao tratamento dos 103 pacientes estudados em portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela no Hospital de Câncer de Barretos.	24
Tabela 9	Características da localização da recidiva locorregional no grupo de pacientes estudados.	26
Tabela 10	Número de linfonodos estudados para cada grupo e de acordo	

com cada marcador. 27

Tabela 11 Frequência de imunoexpressão de PD1 nos linfonodos sentinelas (LS) e regionais de acordo com a presença ou não de metástases em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos. 27

Tabela 12 Frequência de imunoexpressão de PD1 conforme a localização nos linfonodos sentinelas (LS) e regionais de acordo com a presença ou não de metástases em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos. 28

Tabela 13 Frequência de imunoexpressão de VEGF-C nos linfonodos sentinelas (LS) e regionais de acordo com a presença ou não de metástases em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos. 28

Tabela 14 Frequência de imunoexpressão de VEGF-C conforme a localização nos linfonodos sentinelas (LS) e regionais de acordo com a presença ou não de metástases em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos. 28

Tabela 15 Frequência de imunoexpressão de VEGF-A nos linfonodos sentinelas (LS) e regionais de acordo com a presença ou não de metástases em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos. 29

Tabela 16 Frequência de imunoexpressão de VEGF-A conforme a localização nos linfonodos sentinela (LS) e regionais de acordo com a presença ou não de metástases em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos. 29

Tabela 17	Análise de fatores demográficos e clínicos em relação à frequência da expressão dos marcadores PD1, VEGF-C e VEGF-A nos pacientes de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela do Hospital de Câncer de Barretos.	30
Tabela 18	Análise de fatores histopatológicos em relação à frequência da expressão dos marcadores PD1, VEGF-C e VEGF-A nos pacientes de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	31
Tabela 19	Frequência de imunoexpressão do PD-1, VEGF-C e VEGF-A em relação ao Estadiamento Clínico nas três principais categorias analisados por linfonodo individualmente.	33
Tabela 20	Frequência de imunoexpressão de PDL-1 no grupo de linfonodos sentinelas positivos e sua localização em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	33
Tabela 21	Análise dos fatores demográficos e clínicos dos em relação à sobrevida global nos pacientes com melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	41
Tabela 22	Análise dos fatores histopatológicos em relação à sobrevida global nos pacientes com melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	42
Tabela 23	Análise dos fatores demográficos e clínicos dos em relação à sobrevida livre de doença nos pacientes com melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	44
Tabela 24	Análise dos fatores histopatológicos em relação à sobrevida livre de doença em 60 meses nos pacientes com melanoma cutâneo	

	do Hospital de Câncer de Barretos.	44
Tabela 25	Sobrevida global em 1, 3 e 5 anos para PD1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	47
Tabela 26	Sobrevida livre de doença em 1, 3 e 5 anos para PD1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	48
Tabela 27	Sobrevida livre de doença específica por melanoma em 1, 3 e 5 anos para PD1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	49
Tabela 28	Tabela de sobrevida global em 1, 3 e 5 anos para VEGF-C em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	50
Tabela 29	Sobrevida livre de doença em 1, 3 e 5 anos para VEGF-C em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	51
Tabela 30	Sobrevida livre de doença específica por melanoma em 1, 3 e 5 anos para VEGF-C em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	52
Tabela 31	Sobrevida global em 1, 3 e 5 anos para VEGF-A em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	53
Tabela 32	Sobrevida livre de doença em 1, 3 e 5 anos para VEGF-A em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	54

Tabela 33	Sobrevida livre de doença específica por melanoma em 1, 3 e 5 anos para VEGF-A em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	55
Tabela 34	Sobrevida global em 1, 3 e 5 anos para PDL1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	56
Tabela 35	Sobrevida livre de doença em 1, 3 e 5 anos para PDL1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	57
Tabela 36	Sobrevida específica por melanoma em 1, 3 e 5 anos para PDL1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
AJCC	American Joint Committee on Cancer
TNM	Extensão do tumor primário, metástases para linfonodos regionais ou não, metástases à distância
UV	Ultra-violeta
MAPK	Proteínas quinases ativadoras da mitose
PLS	Pesquisa de linfonodo sentinela
LS	Linfonodo sentinela
CTLA 4	Linfócito T citotóxico associado a proteína 4
PD1	Receptor de morte programada
PDL1	Ligante do receptor de morte programada
NK	Natural killer
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
PLGF	Fator de crescimento placentário
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial
LN1+	Linfonodo sentinela positivo
LN1-	Linfonodos sem neoplasia de portadores de linfonodos metastáticos
LN0	Linfonodo sentinela negativo

RESUMO:

Alessi C. Marcadores moleculares relacionados ao microambiente linfonodal nos melanomas com e sem metástase. Dissertação (mestrado). Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2016.

Justificativa: O melanoma cutâneo é a forma mais agressiva de câncer de pele em seres humanos e representa 5% dos tumores de pele. Em 2016, serão 5.670 casos novos no Brasil. É o câncer de pele de maior morbimortalidade, responsável por 77% das mortes por câncer de pele. Seu tratamento é eminentemente cirúrgico e pode estar associado à pesquisa do linfonodo sentinela. O potencial metastático dessa neoplasia é grande, em especial para os linfonodos. Alguns marcadores moleculares associados aos tumores primários são pouco conhecidos em linfonodos, como PD1, PDL1, VEGF C e VEGF A.

Objetivos: Descrever a expressão de VEGF A e C, PD-1 em linfonodos metastáticos e não metastáticos de melanoma e PDL-1 na metástase linfonodal e suas possíveis associações a características da doença e sua evolução e sobrevida.

Materiais e métodos: Estudo observacional retrospectivo onde foram estudados 103 pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo e submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela. O estudo foi realizado através de pesquisa de informação em prontuários dos pacientes e testes realizados em material extraído de blocos de parafina de biópsias prévias. Os pacientes foram divididos em grupos de linfonodos sentinelas negativos (40 casos) e linfonodos sentinelas positivos (38 casos), que tiveram amostras analisadas do linfonodo positivo e os linfonodos negativos da linfadenectomia sequencial (38 casos). Os marcadores foram estudados através de estudo imuno-histoquímico em plataforma automatizada Ventana BenchMark Ultra® (Ventana, Tucson, AZ, USA). A análise das lâminas foi feita por ao menos um patologista. O método considerado foi a positividade para VEGF C e A quando houvesse pelo menos 10% de imunomarcção citoplasmática. Para PDL-1 quando pelo menos 1 a 5% das células tumorais exibirem PDL-1 na membrana. Para PD-1 quando houve pelo menos 5% de positividade em células centrofoliculares ou tumorais.

Resultados: A média de idade foi de 55,2 anos, dos quais 42 pacientes (40,8%) eram do sexo masculino e 61 (59,2%) do sexo feminino. A cor de pele branca foi a mais prevalente, com 89,3% dos casos. Mais de 90% dos pacientes eram de zona urbana, e apenas 10 (9,8%) moravam na zona rural. Em relação ao tumor primário, 53 pacientes (51,2%) apresentavam

lesões em membros inferiores, seguidos de 25 casos em tronco/genital (24,2%) e 15 casos em membros superiores (14,5). Os subtipos mais comuns respectivamente foram nodular (39,2%), disseminativo superficial (37,3%) e acrolentiginoso (17,6%). A média da espessura de Breslow encontrada foi de 4,23 e a mediana 2,8 mm. O PD1 foi positivo em 50% dos linfonodos sentinelas negativos, 26,3% dos linfonodos negativos da linfadenectomia sequencial e 65,7% dos linfonodos sentinelas positivos. Na análise de VEGF C, houve positividade em 69,2% dos linfonodos sentinelas negativos, 52,6% dos linfonodos negativos da linfadenectomia e 84,2% dos linfonodos sentinelas positivos. Na análise de VEGF A, houve positividade em 22,9% dos linfonodos sentinelas negativos, 34,2% dos linfonodos negativos da linfadenectomia e 80,6% dos linfonodos sentinelas positivos. O PDL1 foi estudado apenas no grupo de linfonodos sentinelas positivos, sendo encontrado em 60,7% dos casos. O grupo de linfonodos negativos apresentou sobrevida global e livre de doença maiores em relação ao grupo de linfonodos sentinelas positivos. Em relação aos marcadores estudados, houve diferença na sobrevida global e sobrevida livre de doença apenas para PD1 positivo.

Conclusões: Determinamos a expressão de PD1, VEGF C e VEGF A, em um cenário linfonodal regional, tanto para linfonodos não metastáticos em pacientes sem metástases linfonodais como para linfonodos metastáticos e não metastáticos em pacientes portadores de metástases linfonodais. A expressão de PD1, VEGF A e VEGF C nos linfonodos foi associada a presença da metástase linfonodal e foi muito mais presente no tumor que no tecido linfonodal per si. A expressão dos marcadores PD1, VEGF A e VEGF C nos linfonodos negativos da região com presença de metástase linfonodal não se assemelhou à expressão destes marcadores no linfonodo metastático. Houve associação da expressão de PD 1 em relação à sobrevida global, idade acima de 60 anos e para tumores com T III e IV acometimento linfonodal. Para os demais marcadores não houve associação a nenhuma característica demográfica, clínica ou histopatológica, exceto ao estágio clínico, associado a maior expressão de todos os marcadores na presença de estádios mais avançados.

Palavras-chaves: melanoma metastático; linfonodo sentinela; PD1; PDL-1; VEGF C; VEGF A.

ABSTRACT

Alessi C. Molecular markers associated with lymph nodes region in melanomas with or without metastasis. Dissertation (Master's degree). Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2016.

Background: Cutaneous melanoma is the most aggressive type of skin cancer in humans, representing 5% of skin tumors. For 2016, a total of 5,670 new cases are estimated in Brazil. Cutaneous melanoma is the skin cancer with highest morbimortality, accounting for 77% of deaths from skin cancer. Treatment is mainly surgical and it may be associated with the research of sentinel lymph nodes. This tumor carries a significant metastatic potential, especially to lymph nodes. Some molecular markers associated with primary tumors are little known in lymph nodes, such as PD1, PDL1, VEGF C and VEGF A.

Aims: To describe the expression of VEGF A and C, PD-1 in metastatic and non-metastatic melanoma lymph nodes and PDL-1 in lymph node metastasis and its possible association with the characteristics of the disease and its evolution and survival.

Materials and Methods: A retrospective observational study was carried out on 103 patients affected by cutaneous melanoma, who underwent sentinel lymph node research. The study was conducted through the research of the information found on patients' medical records and tests performed on material extracted from the paraffin blocks of previous biopsies. Patients were divided into groups of negative sentinel lymph nodes (40 cases) and positive sentinel lymph nodes (38 cases), who had samples analyzed both for positive lymph nodes and negative lymph nodes of the sequential lymphadenectomy (38 cases). Markers were assessed by immunohistochemical study with Ventana BenchMark Ultra® (Ventana, Tucson, AZ, USA) automated platform. Analyses of the slides were performed by at least one pathologist. The method employed was positivity for VEGF C and A in the presence of at least 10% of cytoplasmic immunostaining. For PDL-1 when at least 1 to 5% of tumor cells exhibit PDL-1 in the membrane. For PD-1, in the presence of at least 5% positivity in follicle center or tumor cells.

Results: The mean age was 55.2 years, out of which 42 patients (40.8%) were male and 61 (59.2%) female. White skin was the most prevalent skin color, accounting for 89.3% of cases. More than 90% of the patients were from urban areas, and only 10 (9.8%) lived in rural

areas. Regarding the primary tumor, 53 patients (51.2%) had lesions in lower limbs, followed by 25 cases in torso/genitals (24.2%) and 15 cases in upper limbs (14.5). The most common melanoma subtypes, respectively, were nodular (39.2%), superficial spreading (37.3%) and acral lentiginous (17.6%). The mean Breslow thickness was found to be 4.23 and the median 2.8mm. PD1 was positive in 50% of the negative sentinel lymph nodes; 26.3% of the negative lymph nodes of the lymphadenectomy and 65.7% of positive sentinel lymph nodes. VEGF C analysis showed positivity in 69.2% of the negative sentinel lymph nodes; in 52.6% of the negative lymph nodes of the lymphadenectomy and in 84.2% of positive sentinel lymph nodes. The VEGF analysis was positive in 22.9% of negative sentinel lymph nodes; in 34.2% of the lymphadenectomy negative lymph nodes and 80.6% of positive sentinel lymph nodes. PDL1 was studied only in the positive sentinel lymph node group, being found in 60.7% of the cases. The negative lymph nodes group had a larger disease free overall survival in relation to the group with positive sentinel lymph nodes. As for the markers studied, there was difference in overall survival, disease-free survival just for PD 1 positive.

Conclusions: We determined the expression of PD1, VEGFC and VEGFA in a regional lymph node scenario, both for non-metastatic lymph nodes in patients without lymph node metastasis and for metastatic and non-metastatic lymph nodes in patients carrying lymph node metastases;

PD1, VEGF-A and VEGF-C expression in lymph nodes was associated with the presence of lymph node metastasis and was much more present in the tumor than in the lymph node tissue itself;

PD1, VEGF-A and VEGF-C expression markers in negative lymph nodes of the region with the presence of lymph node metastasis did not resemble the expression of these markers in metastatic lymph node;

There was association between PD 1 positive and age (more than 60 years), T III and IV and lymph node disease. For the others, there was also no association with any demographic, clinical or histopathological characteristic except to the clinical stage, associated with an increased expression of all markers in the presence of more advanced stages.

Keywords: metastatic melanoma; sentinel lymph node; PD 1; PDL-1; VEGF C; VEGF A.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Introdução e epidemiologia

O melanoma cutâneo é a forma mais agressiva de câncer de pele em seres humanos¹. Tem origem nos melanócitos, um tipo de célula dendrítica de origem neuroectodérmica, presentes na camada basal da epiderme da pele, mucosas e globo ocular (úvea e íris)^{2, 3}. Essas células são responsáveis pela produção de melanina, pigmento endógeno de cor preta/acastanhada importante na determinação da cor da pele e da pigmentação do epitélio da retina, íris e corpo ciliar dos olhos³.

No Brasil, o câncer de pele representa 25% do total dos casos de tumores malignos. Segundo o INCA – Instituto Nacional de Câncer, é o câncer mais frequente no Brasil. A estimativa é de que ocorram mais de 180.000 casos novos por ano. São divididos em cânceres de pele não-melanoma e melanomas⁴.

Os cânceres de pele não-melanoma são os mais comuns, representando 80.850 casos novos em homens e 94.910 casos em mulheres previstos para 2016. A incidência estimada é de 81,66 casos novos para cada 100.000 homens e 91,98 casos novos para cada 100.000 mulheres. Desses, 70 a 80% são carcinomas basocelulares e 15 a 20% carcinomas espinocelulares⁴.

O melanoma cutâneo representa apenas 5% dos tumores de pele. Em 2016, serão 5.670 casos novos no Brasil, sendo 3.000 casos em homens e 2.670 em mulheres⁽⁴⁾. Sua prevalência no Estado de São Paulo em 2014 foi de 3,97 casos para cada 100.000 homens e 4,59 casos para cada 100.000 mulheres⁵. Em um estudo de revisão epidemiológica realizado em Blumenau, no Estado de Santa Catarina, as taxas de incidência de melanoma atingiram 22,4/100.000 habitantes/ano. Esse estudo comprovou aumento da incidência de melanoma nessa cidade em um período de 30 anos⁵.

De acordo com dados do Globocan de 2012, a incidência mundial de melanoma em homens é de 3,3 para cada 100.000 habitantes e para mulheres de 2,8 para cada 100.000 habitantes. As taxas de mortalidade para cada 100.000 habitantes foi de 0,9 para homens e 0,6 para mulheres⁶. Segundo o INCA, uma estimativa mundial realizada em 2012 evidenciou 232.000 casos novos de melanoma em todo o mundo, com 55.000 óbitos. Mais de 80% dos diagnósticos de melanomas e 65% dos óbitos por esse câncer foram verificados na Oceania, Europa e América do Norte⁴.

Considera-se o melanoma como uma doença maligna epidêmica e sua incidência têm aumentado nas últimas décadas^{4, 6}. É o câncer de pele de maior morbimortalidade e é responsável por 77% das mortes por câncer de pele⁵. No Brasil, o número total de mortes registrado em 2008 foi de 1.311, sendo 754 homens e 557 mulheres⁷.

Nos Estados Unidos, a incidência dessa doença tem aumentado cerca de 2,4% na última década⁸, entretanto 70% dos melanomas são diagnosticados com espessura de Breslow menor que 1 mm⁹.

1.2 Classificação e estadiamento

A classificação dos melanomas foi inicialmente descrita na década de 1970 por Wallace Clark, que observou diferença histopatológica entre os tumores diagnosticados como melanomas e sua relação com o crescimento intraepidérmico e invasão da derme¹⁰. A classificação de Clark define, resumidamente:

Nível I: melanoma intraepidérmico

Nível II: melanoma chega à derme papilar

Nível III: células do melanoma acometem a interface derme papilar e derme reticular

Nível IV: melanoma acomete até derme reticular

Nível V: células chegam ao tecido subcutâneo¹⁰

Além da relação com a invasão tecidual, os subtipos de melanoma são classificados desde 2006 pela proposta da Organização Mundial de Saúde (OMS). Ela divide os melanomas em: extensivo superficial, nodular, lentigo maligno, lentiginoso acral, desmoplásico, associado a um nevo azul, associado a um nevo congênito, infantil, nevoide e ocular^{11, 12}.

Os tipos mais comumente encontrados são:

- Melanoma extensivo superficial: ocorre preferencialmente em adultos jovens (média na quinta década de vida). Acomete áreas expostas ao sol, como tronco, dorso e extremidades. Apresenta crescimento radial em sua fase inicial, pigmentos variados (múltiplas cores) e bordas irregulares. Em sua evolução, apresenta nódulo e ulceração. Podem ter algum grau de espessamento na pele¹². É o subtipo mais comum, representando 75% dos casos da população caucasiana¹³. Na análise histológica, a porção

intraepidérmica apresenta múltiplas células pleomórficas com invasão pagetoide¹².

- Melanoma nodular: acomete pacientes mais velhos que o subtipo anterior, com idade média na sétima década de vida. Pode ocorrer em qualquer localização e geralmente apresentam um rápido crescimento vertical, com formação de nódulo e ulceração. Clinicamente são tumores nodulares que podem ter ulceração e hemorragia¹². Ocorre em 20 a 25% dos casos da população caucasiana¹³. Na histologia, apresenta células pleomórficas com componente na epiderme e derme de disposição nodular, e não há componente semelhante ao extensivo superficial¹².
- Lentigo maligno melanoma: ocorre em pacientes idosos, média de idade na década de 80. Geralmente se desenvolve em áreas de exposição crônica ao sol, como cabeça, pescoço e antebraços. Manifesta-se como manchas acastanhadas grandes, de bordas irregulares, superfície lisa¹². Ocorre em 5 a 10% dos casos na população caucasiana¹³. Em seu padrão histológico apresenta proliferação atípica dos melanócitos, que se dispõem um ao lado do outro. Nota-se intenso dano da pele ao redor, com elastose e atrofia da derme¹².
- Melanoma lentiginoso acral: surge em palmas e plantas ou região subungueal (pele glabra). Ocorre indistintamente em todos os tipos de pele, podendo surgir em pessoas de pele escura, origem asiática ou indígena com a mesma proporção, diferente dos outros subtipos. Aparenta uma mancha acastanhada de bordas irregulares e pigmentos variados semelhantes ao subtipo lentigo maligno. Geralmente tem crescimento lento¹². É responsável por até 5% dos casos de melanoma na população caucasiana, porém chega a 80% dos casos da raça negra¹³. Na histologia apresenta melanócitos atípicos na junção dermo-epidérmica¹².

Os outros subtipos de melanomas são menos frequentes, mas conhecer e classificar corretamente o tipo é fundamental para entendimento da evolução da doença.

No ano de 1970, Breslow publicou um artigo que apontava a espessura do tumor como um dos fatores mais relevantes relacionados ao prognóstico. Nesse artigo foi estudada a associação entre a espessura, medida da superfície do tumor até o ponto mais profundo

na pele, em milímetros, num corte transversal e a sobrevida livre de doença em cinco anos. Foi demonstrado, nessa condição, 100% de sobrevida livre de doença para pacientes com espessura do tumor menor que 0,75 mm¹⁴. Os dados completos estão mostrados na Tabela 1:

Tabela 1 - Relação da espessura de Breslow com a sobrevida livre de doença em cinco anos¹⁴.

Espessura do melanoma (mm)	Sobrevida livre de doença em 5 anos (%)
<0,76	100
0,76 – 1,50	73,7
1,51 – 2,25	78,6
2,26 – 3,0	44,4
>3,0	22,2

Além das características histopatológicas de cada subtipo e a espessura tumoral, chamada então espessura de Breslow, é crucial a avaliação de algumas características tumorais nos melanomas associadas ao prognóstico. São destacados para tumores primários: a espessura do tumor em milímetros (espessura de Breslow); presença de ulceração e índice mitótico (número de mitoses por milímetro quadrado (mm²)¹⁵.

Balch e colaboradores, em um trabalho utilizando a base de dados prospectiva de mais de 30 mil melanomas oriundos de 17 instituições da American Joint Committee on Cancer (AJCC), definiram e descreveram fatores de risco que fazem parte da atual classificação TNM dessa neoplasia¹⁵.

A classificação TNM, definida em 2009¹⁵, utiliza três características para estadiamento e prognóstico do melanoma. A letra T indica a extensão do tumor primário, N a presença ou não de metástases para linfonodos regionais e M a presença ou não de metástases à distância¹⁵.

As Tabelas 2, 3, 4 e 5 apresentam essa classificação:

Tabela 2 - Classificação do tumor primário, segundo a AJCC – 2009 – melanoma cutâneo.

Classificação	Espessura (mm)	Ulceração e/ou mitose
Tis	NA*	NA*
T1	≤1,00	a: sem ulceração e índice mitótico <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

*NA = não avaliável

Tabela 3 - Avaliação da metástase linfonodal, segundo a AJCC – 2009 – melanoma cutâneo.

Classificação N	No de linfonodos metastáticos (LM)	Extensão da metástase linfonodal
N0	0	NA*
N1	1	a: micrometástases b: macrometástases
N2	2 – 3	a: micrometástases b: macrometástases c: metástase em trânsito/satelitose sem LM
N3	≥4 LM; conglomerado linfonodal, metástases em trânsito/satelitose com LM	

*NA = não avaliável

Tabela 4 - Avaliação da metástase à distância, segundo a AJCC – 2009 – melanoma cutâneo.

Classificação M	Localização	Nível de DHL
M0	Sem metástase à distância	NA*
M1a	Pele, tecido subcutâneo ou linfonodos não regionais	Normal
M1b	Metástase pulmonar	Normal
M1c	Outras metástases viscerais	Normal Elevada
	Qualquer metástase à distância	

*NA = não avaliável

Tabela 5 - Estadiamento clínico, segundo a AJCC – 2009 – melanoma cutâneo.

	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1 – 4a	N1a	M0
	T1 – 4a	N2a	M0
IIIB	T1 – 4b	N1a	M0
	T1 – 4b	N2a	M0
	T1 – 4a	N1b	M0
	T1 – 4a	N2b	M0

Tabela 5 - Estadiamento clínico, segundo a AJCC – 2009 – melanoma cutâneo.

	T	N	M
IIIC	T1 – 4a	N2c	M0
	T1 – 4b	N1b	M0
	T1 – 4b	N2b	M0
	T1 – 4b	N2c	M0
	Qualquer T	N3	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

1.3 Fatores de risco

O melanoma ocorre preferencialmente em pessoas de pele clara, em geral populações de origem caucasiana. Outros fatores de risco são olhos claros, cabelos loiros, tendência a queimar ao invés de bronzear quando exposto ao sol, história de queimadura solar na infância, sardas, múltiplos nevos e história de câncer de pele na família^{5, 11, 13}. O risco de desenvolver melanoma na população branca é de aproximadamente 1 para 50, comparado ao risco de 1 em 1.000 na população negra (Africana)⁸.

Além dessas características, o surgimento do melanoma está diretamente relacionado à exposição excessiva aos raios ultravioleta (UV)¹⁶. A radiação UV é o fator etiológico mais importante no desenvolvimento dos tumores de pele, inclusive do melanoma localizado em áreas expostas ao sol. Em especial, a exposição solar intermitente parece ser o fator de risco mais importante^{16, 17}. Os melanócitos tem uma função biológica responsiva à exposição solar, que é a melanogênese. O aumento da produção de melanina é um mecanismo de defesa das células da epiderme¹⁶. Porém, a luz UV também exerce papel mutagênico sobre essas células, por meio do dano ao DNA celular e liberação de radicais livres de oxigênio. Com a ocorrência repetida desses danos e uma insuficiência do sistema de defesa do organismo, ocorre a transformação maligna do melanócito^{16, 18}.

A partir do século 21, com os avanços biologia molecular, foram descritas alterações mutagênicas na via das proteínas quinases ativadoras da mitose (MAPK), com mutações nas vias RAS-RAF-MEK-ERK descritas, individualmente, na maioria dos subtipos de melanoma. A mutação mais encontrada foi do gene *BRAF* presente em cerca de 40 a 50% dos tumores¹⁷.

1.4 Diagnóstico e tratamento

1.4.1 Tratamento da lesão primária

O diagnóstico do melanoma cutâneo é essencialmente histopatológico. A partir da suspeita clínica realiza-se a biópsia excisional com 2 mm de margem e a confirmação histopatológica. O tratamento do melanoma localizado é cirúrgico¹⁹.

Confirmado o diagnóstico e de acordo com as características histopatológicas do tumor e seu estadiamento, deve-se realizar a ampliação de margens cirúrgicas e, quando indicado, a pesquisa de linfonodo sentinela (PLS). A orientação das margens cirúrgicas é recomendada de acordo com a espessura de Breslow (Tabela 6)¹⁹:

Tabela 6 - Orientação da margem cirúrgica de acordo com a medida de Breslow.

Breslow (mm)	Margem da excisão
<i>In situ</i>	1 cm
<1,00	1 cm em qualquer localização anatômica
1,01 a 2,00	1 a 2 cm em cabeça/colo e extremidade distal 2 cm em tronco e extremidade proximal
>2,00	1 a 2 cm em cabeça/colo e extremidade distal 2 cm em tronco e extremidade proximal

1.4.2 Pesquisa do linfonodo sentinela e tratamento das metástases linfonodais

Visto que a metástase é o fator prognóstico mais importante ao se diagnosticar um melanoma, a pesquisa de linfonodo sentinela (PLS) visa diagnosticar precocemente as metástases linfonodais^{2, 6}.

A Técnica da pesquisa de linfonodo sentinela foi desenvolvida na década de 1990. É uma técnica minimamente invasiva e o padrão ouro para avaliação de disseminação linfática de melanoma cutâneo primário²⁰.

Um estudo Multicêntrico publicado em 2014, realizado com 1.270 pacientes com diagnóstico de melanoma fino ou de espessura intermediária, em que 770 casos realizaram PLS e 500 permaneceram sob observação clínica, por meio de uma análise multivariada, sugeriu que o *status* do linfonodo sentinela seria o principal preditor de recorrência da

doença ou morte por melanoma. No entanto, o método não apresentou benefício de aumento de sobrevida global aos submetidos à técnica PLS, e sim a subgrupos específicos, em particular os portadores de metástases ocultas, mas isso tem sido alvo de críticas metodológicas^{21, 22}.

Na tentativa de tratar precocemente as metástases linfonodais, até a década de 1960 praticamente todos os pacientes com doença localizada eram submetidos à dissecação e ressecção eletiva dos linfonodos regionais. Com estudos prospectivos, observou-se que apenas 20% dos pacientes submetidos à linfadenectomia apresentavam metástase ao diagnóstico. Por outro lado, constatou-se que grande número dos pacientes foram submetidos a um procedimento que resultou em comorbidades tais como linfedema, seroma e injúria neural, entre outras, sem necessidade^{20, 23}. Houve um progresso com a seleção de certos grupos que não se beneficiariam da linfadenectomia imediata, mas ainda assim a linfadenectomia profilática ou eletiva era utilizada ao menos em portadores de melanomas de espessura intermediária²⁴.

Foi então que na década de 1990, *Morton et al* desenvolveram a técnica da pesquisa ou biópsia do linfonodo sentinela, baseado no fato de que a drenagem linfática tumoral é direcionada de maneira identificável para um ou mais linfonodos de uma cadeia linfática regional²⁰. A presença ou ausência de metástases nesses primeiros linfonodos, chamados sentinelas, prediz com grande sensibilidade e especificidade o *status* tumoral linfonodal, comprovada por múltiplos estudos^{21, 23}. Um deles, multicêntrico, realizado em 2005, teve acurácia de 95,3% na identificação do linfonodo sentinela, com taxas ainda maiores quando avaliados isoladamente - região inguinal ou axilar²³.

A biópsia do linfonodo sentinela permite que seja feita uma avaliação detalhada por meio de técnicas de imuno-histoquímica, aumentando a acurácia do método²⁰. Um estudo pioneiro de *Cochran et al* (1988) demonstrou que a imuno-histoquímica foi capaz de detectar metástase em 14% dos linfonodos negativos na rotina de hematoxina-eosina²⁵.

A pesquisa do linfonodo sentinela necessita de uma equipe multidisciplinar que envolve especialistas da medicina nuclear, cirurgião e patologista²⁰.

Com os estudos envolvidos na indicação da pesquisa de linfonodo sentinela, observou-se que a espessura do tumor é um dos principais determinantes da metástase. Outras características relacionadas ao tumor primário, como índice mitótico, ulceração, nível de Clark também estão relacionados a um aumento desse risco²⁰.

De acordo com o risco de desenvolvimento de metástase linfonodal indica-se o procedimento. Portadores de lesões de baixo risco para o desenvolvimento de doença linfonodal em princípio são dispensados da PLS, que são os melanomas finos sem características histopatológicas de risco, como ulceração e mitose. Em linhas gerais a PLS é recomendada quando a neoplasia apresenta as seguintes características:

- ✓ melanomas cutâneos localizados (sem evidência clínica de metástases linfonodais ou em outros órgãos);
- ✓ Tumores com espessura de Breslow maior ou igual a 1mm;
- ✓ Tumores com espessura menor que 1mm em pacientes que sejam considerados de alto risco. São considerados alto risco pacientes que apresentam no exame histopatológico, ulceração ou índice mitótico maior de 1/mm², principalmente nos casos de espessura de Breslow entre 0,75 e 0,99mm⁹.

Existem duas técnicas utilizadas consideradas padrão ouro, que estão incorporadas na rotina do tratamento do melanoma no Hospital de Câncer de Barretos: a linfocintilografia pré-operatória com gama probe intraoperatório e o corante azul patente intraoperatório. Antes da cirurgia, os pacientes realizam a linfocintilografia para definir a cadeia linfática de drenagem e localizar o linfonodo sentinela. Utiliza-se tecnécio 99 meta-estável intradérmico em 2 a 4 pontos ao redor da cicatriz da biópsia. Imediatamente após, obtêm-se imagens dinâmicas para visualização da drenagem linfática e possibilita a marcação da projeção desses linfonodos na pele. Na sala cirúrgica, injeta-se o azul patente no sítio tumoral e aguarda-se 10 minutos para dar início ao procedimento. Através de uma incisão na pele no local indicado pela linfocintilografia, realiza-se a inspeção visual à procura de vias de drenagem coradas em azul. Localizado o linfonodo de drenagem corado em azul, faz-se sua exérese e mede-se sua radioatividade ex-vivo, para comparar se foi também o linfonodo que primeiro recebeu o tecnécio, por meio de uma fonte de baixa atividade (gama probe) para confirmar o local encontrado na linfocintilografia. Em aproximadamente 70% dos casos apenas um linfonodo é identificado. Em cerca de 20% dos casos, dois linfonodos são identificados e no restante, mais de 2 linfonodos²⁰.

O linfonodo sentinela é submetido a exame anatomopatológico por cortes seriados em hematoxilina-eosina e estudo imuno-histoquímico da proteína S100 e antígeno HMB-45. Se comprovada a presença de micrometástases, realiza-se a linfadenectomia regional

eletiva^{5, 26}. Em um estudo americano, foi encontrado 20% de positividade nos linfonodos resultantes da linfadenectomia⁹.

Esse método é capaz de detectar micrometástases em 97,3% a 98,6% dos casos⁹. As taxas de falso-negativos, na literatura, variam de 4% a 12,5%^{6, 9, 27} e probabilidade de pós-teste negativo de 3,4%⁹. Na casuística do Hospital de Câncer de Barretos que avaliou todos os pacientes com diagnóstico de melanoma de 1997 a 2001, totalizando 1.073 pacientes, 373 casos foram submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela. A taxa de positividade foi 23,8%. Dos 284 casos (76,2%) que apresentaram resultado negativo na PLS, houve recorrência locorregional em 9,8% deles, incluindo recidivas em linfonodos, no sítio primário ou em metástases em trânsito²⁸.

O risco de um paciente com melanoma fino (espessura menor que 1 mm) desenvolver metástase linfonodal é de 5%⁹. Para os melanomas de espessura intermediária (Breslow entre 1 e 4mm) a metástase para linfonodos regionais pode ocorrer em até 20% dos pacientes. E para melanomas com espessura de Breslow acima de 4 mm, o risco de metástase é maior que 20%⁹. Em um estudo realizado no Hospital de Câncer de Barretos, a taxa de sobrevida global em 5 anos global foi de 67,6%, porém foi significativamente maior nos pacientes em Estadio I e II, demonstrando que os casos avançados provocam um impacto relevante na sobrevida global²⁸. Por isso, o diagnóstico precoce é muito importante para evitar as metástases.

Confirmada a metástase linfonodal, deve-se realizar a linfadenectomia radical no sítio da metástase¹⁹.

A taxa de recorrência linfonodal, em pacientes com PLS negativa, foi de 6,3% em um seguimento de seis anos, mostrando o sucesso do procedimento²³. Um estudo retrospectivo realizado na Alemanha em 2015 encontrou taxa de PLS falsos negativos de 10% se todas as recorrências nodais forem consideradas e 6,4% se considerada apenas recidiva no mesmo local do procedimento, com valor preditivo negativo de 95,9% e sobrevida livre de doença em 5 anos de 94,6%. Nos pacientes LS positivos submetidos à cirurgia complementar, as taxas de recidiva local em 5 anos nos pacientes sem doença no restante dos linfonodos foi de 14,5%, contrastando com 28% encontrado nos casos com mais linfonodos positivos²⁹. Em relação à recorrência após linfadenectomia em pacientes com PLS positivo, em uma metanálise realizada em 2011, houve recidiva no mesmo sítio nodal em 7,5% dos pacientes com LS tratados em um ano³⁰.

1.4.3 Tratamento da doença disseminada

Existem dois grupos principais de portadores de melanoma disseminado. Aqueles com doença limitada a pele, tecidos subcutâneo e linfonodal, e os portadores de doença visceral, em particular nos pulmões, sistema nervoso central e fígado. O tratamento da doença disseminada pode ser cirúrgico para doença limitada e com baixa morbidade do tratamento, radioterapia para palição dos sintomas – principalmente dor e terapia sistêmica, o que tradicionalmente até 2010 era mono ou poliquimioterapia citotóxica, sendo a dacarbazina a droga padrão, caracterizada por baixa taxa de efeitos adversos e também baixa taxa de resposta³¹. As taxas esperadas de sobrevida eram de 25% em um ano e 15% em três anos, com média de 7,5 meses^{4, 5}.

A partir de 2011, com o advento de novas modalidades terapêuticas, houve aumento global da sobrevida desses pacientes. Surgiram duas novas classes de medicamentos: os bloqueadores dos inibidores imunológicos (immune checkpoint blockade), exemplificados pelo anti-CTLA 4 (Ipilimumab, nome comercial Yervoy®, do laboratório Bristol-Myers Squibb, Empresa Americana), e anti-PD1 (Nivolumab, Opdivo® nome comercial, do laboratório Bristol-Myers Squibb, Empresa Americana e Pembrolizumab, nome comercial Keytruda®, do laboratório Merck & Co, americana) drogas que melhoram a imunidade antitumoral dos portadores de melanoma, e a terapia alvo molecular, como os bloqueadores da via MAPK (quinase proteica específica serina/treonina), como exemplo anti-BRAF (Vemurafenib, nome comercial Zelboraf®, laboratório Roche, Suíça e Dabrafenib, nome comercial Tafinlar®, do laboratório GlaxoSmithKline – GSK, Reino Unido) e anti-MEK (Trametinib, nome comercial Mekinist®, do laboratório GlaxoSmithKline – GSK, Reino Unido); Pimasertib, AS703026, medicamento em fase II, da Merck Biopharma, empresa alemã; Selumetinib, AZD6244, descoberto pela Array Biopharma, empresa americana), disponível para portadores de tumores com mutação no gene BRAF³². Alguns estudos controlados encontraram aumento da sobrevida global de até 47,3% em 1 ano e até 20,8% em 3 anos com esses medicamentos³³. Por outro lado a imunoterapia tem provado expressiva resposta terapêutica. O anti CTLA-4 (Ipilimumab) foi a primeira droga a substituir a quimioterapia como primeira linha do tratamento de melanoma metastático. A resposta ao uso de drogas anti-PD-1 e mais ainda a sua associação com anti CTLA-4 é muito robusta e hoje é considerada nos Estados Unidos como tratamento inicial de melanoma metastático,

independente do status mutacional ou de marcador específico, isso já corroborado por inúmeros estudos randomizados³².

1.5 Marcadores moleculares e o microambiente linfonodal

Nos últimos anos, com o conhecimento dos biomarcadores, a busca por características que possam elucidar os mecanismos de metástases dos melanomas têm sido intensa. Novos alvos para classificação molecular dos melanomas e aperfeiçoamento da terapêutica para os casos metastáticos são de grande importância³³. Os estudos moleculares visam identificar os genes e caminhos genéticos envolvidos na progressão do melanoma, com objetivo terapêutico e preventivo³³. Como o potencial metastático do melanoma é alto e existe tropismo para órgãos específicos como os linfonodos, tecido subcutâneo, pele e sistema nervoso central³⁴, tentar encontrar alterações moleculares dentro do microambiente sujeito à metástase, capazes de entender e prever o seu surgimento, tem importância prognóstica e terapêutica³⁵.

Múltiplos estudos tem demonstrado a importância do microambiente nos tumores, pois as células tumorais compõem um sistema de cooperação e competição que as torna muito mais complexas do que um simples grupo de células mutadas clonadas³⁶. As células neoplásicas são capazes de gerenciar todo o ambiente a seu favor, e ainda inibir a resposta imune antitumor³⁷. O microambiente tumoral é complexo e composto por matriz extracelular, vários tipos celulares presentes no estroma e os adipócitos. As células do estroma do tumor englobam macrófagos, fibroblastos e células endoteliais do tumor. Estas têm capacidade de secretar substâncias que sustentam o crescimento tumoral, angiogênese, invasão e metástase³⁷. Algumas mutações no gene BRAF, por exemplo, induzem as células tumorais a produzirem citocinas pró-inflamatórias como VEGF, IL-10 e IL-6, e ao mesmo tempo, diminuem a expressão de citocinas antitumorais, como a IL-12³⁶.

Além disso, o microambiente tumoral apresenta resposta inflamatória crônica, que transporta várias células imunes e tem efeito na progressão tumoral. Estão presentes no tumor macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* (NK), células T helper e células B³⁸. Os macrófagos associados ao tumor secretam fatores de crescimento, citocinas, promovendo angiogênese e metástase³⁷. Além disso, a resposta imune do hospedeiro se torna deficiente, tendo sua função reduzida ou inibida por substâncias do microambiente, como ácido láctico, prostaglandinas e fator de crescimento beta (TGFβ) ou ainda pela

expressão de PDL-1 na membrana das células tumorais³⁹. Fridman em 2012 considerou que “evitar a destruição imune” poderia ser considerado um novo “hallmark of cancer”³⁸.

Frente a esse conhecimento, alguns marcadores moleculares estão sendo estudados nos casos de melanomas metastáticos: o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o receptor de morte programada 1 (PD-1), ambos presentes no microambiente tumoral.

O PD-1 é considerado um receptor inibitório da ativação de células imunes^{40, 41}. Pertence à família CD28 e desempenha um papel crucial na resistência dos tumores ao sistema imune⁴². A descoberta do PD-1 chamou a atenção para os métodos de resistência do tumor aos sistemas de defesa, sendo este um importante mecanismo⁴³.

O PD-1 é expresso em células T, células B e células mielóides. Ele também é expresso em células T regulatórias, as quais interagem com células NK e células dendríticas. Essa interação provoca anergia das células T e diminuição da resposta imune antitumoral⁴⁴. Os seus ligantes PDL-1 e PDL-2 são expressos nas células tumorais, células apresentadoras de antígenos (APC) e outras células do microambiente tumoral, como macrófagos e células dendríticas^{42, 45}. A presença constitucional de PDL-1 em tonsilas e placenta indica que há uma modulação constitucional por esses marcadores⁴³.

A interação do PD-1 com seu ligante favorece o desenvolvimento tumoral de diversas formas: propicia maior resistência da célula tumoral; induz a apoptose das células T de defesa; inibe o crescimento da célula T e a secreção de citocinas e impede a ação imunológica da célula T sobre a célula tumoral. Também é capaz de tornar a célula tumoral mais resistente à própria apoptose^{42, 43, 45}. A presença de PDL-1 na célula tumoral parece ser um eficiente mecanismo contra a imunidade antitumoral do hospedeiro em seu microambiente^{46, 47}.

Uma das evidências do papel imunológico do PD-1 é demonstrada em um estudo com roedores com deficiência da PD-1 onde houve desenvolvimento de doenças sistêmicas e autoimunes⁴⁶.

A maior expressão do PDL-1 nas células tumorais está relacionada ao prognóstico dessa neoplasia e com menor sobrevida^{44, 46}. Os tumores com expressão de PDL-1 conseguem criar um microambiente tumoral favorável a eles^{41, 48}, o que lhes permite superar a ação do sistema imune^{45, 49}.

A taxas de positividade do PDL-1 observadas em estudos prévios no melanoma metastático foi de 40 a 43%⁴⁹, podendo chegar a 90% em alguns casos⁵⁰.

Tarhini et al em 2015 estudaram a presença do PDL-1 em linfonodos sentinelas positivos para micrometástases, e notou que esses linfonodos apresentam expressão de PDL-1 positivo na membrana de células tumorais em 52% dos casos, indicando que o estudo desse marcador em linfonodos possa ser utilizado como um biomarcador preditivo de metástase⁴⁴.

Kakavand et al, também em 2015, avaliou 60 linfonodos sentinelas positivos e encontrou expressão maior que 1% de PDL-1 nas membranas de células tumorais em 26 casos (43%). Não houve relação entre a porcentagem de PDL-1 e idade, sexo, número de linfonodos positivos, Breslow ou ulceração. Também não houve associação entre esse marcador e a sobrevida global e sobrevida livre de doença dos pacientes, porém reforça a utilização e drogas anti-PDL1 para esses pacientes⁵¹.

Há pouco de mais de dois anos algumas drogas anti-PD1 (inibidoras do PD-1) foram desenvolvidas e já estão sendo utilizadas em ensaios clínicos fase III. Dois anticorpos monoclonais anti-PD1, o Pembrolizumab e Nivolumab se mostraram eficazes em pacientes com melanoma metastático. O uso de Pembrolizumab aumentou o tempo livre de progressão da doença e sobrevida global. Ambos já estão aprovados para uso nos Estados Unidos^{32, 52}. Essas drogas são terapias de grande valor para pacientes com tumores metastáticos^{32, 46, 52, 53}.

O melanoma cutâneo é conhecido por seu grande potencial metastático, em especial por via linfática. A linfangiogênese é uma pré-condição para o crescimento tumoral e disseminação precoce para os linfonodos⁵⁴. As recentes descobertas de fatores de crescimento específicos desse evento, sendo o principal deles o VEGF-C e VEGF-D, comprovam a importância da neovascularização linfática para o melanoma e a provável relação entre a presença desse fator e a agressividade do tumor⁵⁵. Além disso, os melanomas estão associados a intensa angiogênese, que favorece a disseminação por via hematogênica⁵⁶.

Esses eventos são estimulados por uma família de fatores de crescimento pró-angiogênicos conhecidos como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular)⁴⁰. A família VEGF compreende seis glicoproteínas estruturalmente relacionadas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PLGF (fator de crescimento placentário)⁵⁴. Destes, serão estudados o VEGF-A, relacionada à angiogênese e a VEGF-C, mais relacionada à linfangiogênese⁴⁰.

O VEGF é secretado por células do tumor e do estroma^{37, 54}. A participação das células do estroma, notadamente dos macrófagos e fibroblastos associados ao tumor, é mais acentuada do que as próprias células tumorais⁵⁵. Múltiplos fatores de crescimento e citocinas estão presentes nesse microambiente tumoral, e coletivamente modulam o crescimento do tumor, sua capacidade de invasão e metástase⁴⁷. O aumento da expressão do VEGF nos tumores está associado a um aumento do potencial metastático e menor sobrevida⁵⁶.

A família VEGF se liga a três diferentes receptores de membrana que pertencem à família dos receptores tirosina-quinase: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 (das células endoteliais linfáticas)⁵⁴. Esses receptores estão presentes nas células endoteliais dos vasos linfáticos³⁴.

O VEGF-C induz, seletivamente, hiperplasia dos vasos linfáticos. Sua produção mantém-se elevada para que novos capilares linfáticos sejam continuamente formados⁵⁴. Ele é o fator de crescimento mais potente secretado pelas células tumorais⁵⁷.

O VEGF-C pode ser utilizado como um marcador precoce de metástases linfonodais. O aumento do VEGF-C pode ocorrer em linfonodos antes mesmo da própria metástase celular⁵⁸. Em vista disso, alterações precoces na linfangiogênese podem indicar uma má evolução de um paciente com melanoma cutâneo^{35, 58}. Estudos recentes comprovaram relação entre a positividade de VEGF no tumor e a presença de linfonodos sentinelas positivos^{47, 55}.

No processo de angiogênese, o VEGF-A estimula a sobrevivência das células endoteliais, sua proliferação e motilidade, e o brotamento de novos capilares⁴⁰. Também modula a permeabilidade vascular, a sobrevida do vaso e o seu remodelamento⁴⁷. O acionamento da angiogênese é controlado por diversos estímulos, sendo a hipóxia e o processo inflamatório os principais deles^{37, 40, 47}. A neovascularização induzida pelo VEGF-A, além de propiciar a disseminação da célula metastática favorece a nutrição e crescimento do próprio tumor³⁸.

Em um estudo sobre metástases cerebrais, foi descrito que ao atingir tamanho de aproximadamente 3mm, o tumor já apresenta angiogênese que envolve a via do VEGF. A atividade do VEGF pode ocorrer como resposta a uma hipóxia do tumor ou desregulação dos supressores de tumor⁴⁸.

Em 2005, em um estudo que comparava melanomas sabidamente com PSL positivo com melanomas PSL negativo, foi comprovado o aumento significativo de VEGF nas amostras de melanomas metastáticos⁵⁹.

Estudos prévios comprovam que o VEGF no melanoma cutâneo é promotor da proliferação e invasão dos vasos linfáticos, e tem correlação direta com a metástase regional³⁴. Porém, o microambiente linfonodal ainda é pouco conhecido e não se sabe quais características motivam precocemente a metástase para os vasos linfáticos nos melanomas cutâneos.

A pergunta crucial a ser respondida neste estudo é se a caracterização molecular de expressão de VEGF A e C, PDL-1 e PD-1 nos linfonodos pode relacionar-se ao surgimento de metástases locais, ao prognóstico e a outras características relacionadas ao paciente, patologia e ao tratamento.

2 OBJETIVOS

- 1- Descrever a expressão de VEGF A e C, PD-1 em linfonodos metastáticos e não metastáticos de melanoma e PDL-1 na metástase linfonodal;
- 2- Associar a presença desses marcadores com características demográficas, clínicas, histopatológicas (com foco no risco de micrometastase linfonodal) e relacionadas à progressão da doença e sobrevida.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ética na pesquisa

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (CEP-HCB) e obteve aprovação sob número 760/2013.

Por se tratar de um estudo retrospectivo, não foi aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com o CEP-HCB. Os dados clínicos foram recuperados por meio de prontuários arquivados no Serviço de Arquivo de Estatística Médica (SAME).

3.2 Desenho do estudo

Estudo observacional coorte retrospectivo.

3.3 Critérios de inclusão

1. Pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo e que foram submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela, maiores de 18 anos.
2. Pelo menos 1 bloco de parafina contendo os linfonodos escolhidos para o estudo, e que esteja disponível no arquivo do Serviço de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos.

3.4 Critérios de exclusão

1. Ausência de dados clínicos mínimos para preenchimento do banco de dados durante a análise dos prontuários do SAME.
2. Bloco de parafina com material insatisfatório para confecção das lâminas de imuno-histoquímica.

3.5 População de estudo

Foram selecionados 103 pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo e que realizaram pesquisa de linfonodo sentinela, extraídos do banco de dados de melanoma, já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos em projeto 548/2011. Esse banco de dados contava com 380 pacientes, sendo que 290 deles apresentavam linfonodos sentinela negativos e 90 pacientes apresentavam linfonodo sentinela positivo. A escolha dos casos utilizados nessa pesquisa foi por conveniência.

Todos os casos foram atendidos no Hospital do Câncer de Barretos no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2011 e submetidos à revisão de prontuários individualmente. Foram estudados dois grupos: os portadores de linfonodos sentinela positivos, onde serão estudados os linfonodos positivos para neoplasia e também os linfonodos negativos obtidos na cirurgia sequencial da linfadenectomia; e os portadores de linfonodos sentinela negativos.

Após revisão dos prontuários, todas as informações foram registradas em programa SPSS para Windows, versão 21.0 para estruturação do banco de dados.

3.6 Confeção das lâminas de imuno-histoquímica

Os tecidos foram recuperados de blocos de parafina arquivados no Serviço de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos. Cada lâmina foi composta por cerca de 3 amostras de linfonodos.

As lâminas foram submetidas às reações de imuno-histoquímica em plataforma automatizada Ventana BenchMark Ultra® (Ventana, Tucson, AZ, USA).

Resumidamente, os procedimentos da técnica de imuno-histoquímica consistiram nos passos a seguir. Todas as lâminas foram previamente incubadas em estufa durante 20 minutos à temperatura de 100° C para desparafinização inicial. Na sequência foram transferidas para o equipamento Ventana BenchMark Ultra®, que possui um painel com programas específicos e bem estabelecidos de incubação.

Uma vez inseridas na plataforma automatizada, as lâminas foram novamente submetidas à desparafinização a 72°C, recebendo também uma solução de lavagem EZ Prep para remoção da parafina residual. Seguiu-se de uma lavagem com solução tampão, para posterior recuperação antigênica com solução cell conditioning CC1 de pH alto. Na sequência, procedeu-se o bloqueio das peroxidases endógenas com água oxigenada a 3%. Após o bloqueio das peroxidases, e com as diluições e tempo de recuperação antigênica padronizada para cada um dos anticorpos inseridos no estudo, procedeu-se a incubação das lâminas com o anticorpo primário. Seguido desta incubação, as lâminas receberam o anticorpo secundário.

Para detecção da proteína PD1 utilizou-se o anticorpo monoclonal de rato anti-PD1 (Clone: NAT 105, ab52587 – Abcam) e o sistema ultraView universal detection kit e para detecção do PDL1, o anticorpo policlonal de coelho anti-CD274(PDL1), ab58810 – Abcam. Os

anticorpos foram diluídos nos seguintes títulos respectivamente: 1:100 e 1:25. Na plataforma Ventana BenchMark Ultra®, as lâminas foram aquecidas e novamente desparafinizadas a 75° C por quatro minutos. Para a recuperação antigênica, utilizou-se o tampão de recuperação alcalino (Ph: 8,5) por 64 minutos a 97° C, sendo realizado em seguida a titulação dos anticorpos PD1 (1:100) e PDL1 (1:25) e incubação por uma hora a 36° C. Após, o sistema de detecção realizou amplificação e visualização, ambos revelados por peróxido de hidrogênio e UV Cooper, um reagente que faz parte do sistema de detecção na presença de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB). Esse processo torna a marcação visível através da precipitação da coloração marrom proporcionada pela precipitação da DAB. Em seguida, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina por 4 minutos, desidratadas e montadas com meio de montagem permanente (Entellan – Merck) e lamínula.

Para detecção do VEGF-C e VEGF-A utilizou-se o anticorpo monoclonal de rato anti-VEGF-C (Clone: Polyclonal – Invitrogen) e anti-VEGF-A (Clone: VG1 – Abcam) e o sistema ultraView universal detection kit. Os anticorpos foram diluídos nos seguintes títulos: 1:200 para VEGF-C e 1:200 para VEGF-A. Na plataforma Ventana BenchMark Ultra®, as lâminas foram aquecidas e novamente desparafinizadas a 75° C por quatro minutos. Para a recuperação antigênica, utilizou-se o tampão de recuperação alcalino (Ph: 8,5) por 20 minutos a 97° C, sendo realizado em seguida a titulação dos anticorpos VEGF-C (1:200) e VEGF-A (1:200) e incubação por uma hora a 36° C. Após esse passo, o sistema ultraView de detecção aplicado proporcionou amplificação e visualização, revelados por peróxido de hidrogênio e UV Cooper, um reagente que faz parte do sistema de detecção na presença de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB). Esse processo torna a marcação visível devido a coloração marrom proporcionada pela DAB precipitada quando em contato com a peroxidase. Em seguida, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina por 4 minutos, desidratadas e montadas com meio de montagem permanente (Entellan – Merck) e lamínula.

3.7 Análise das lâminas

A análise das lâminas foi feita por ao menos um patologista. O método considerado foi a positividade para VEGF C e A quando houvesse pelo menos 10% de imunomarcação citoplasmática (35). Para PDL-1 quando pelo menos 1 a 5% das células tumorais exibirem PDL-1 na membrana (47, 49). Para PD-1 quando houve pelo menos 5% de positividade em células centrofoliculares ou tumorais (53).

Os casos LN1-, que rotineiramente não são submetidos a estudo imuno-histoquímico, foram submetidos a esse exame para comprovação de negatividade para metástase. Foram realizados cortes seriados com a mesma padronização feita para a pesquisa do linfonodo sentinela e os testes HMB 45 e Melan A em 5 casos (13,1% da amostra estudada) que resultou não metastático de fato.

3.8 Análise estatística

Os resultados dos testes imuno-histoquímicos foram incorporados aos dados clínicos, demográficos, histopatológicos e relacionados ao tratamento e estado do paciente em relação à neoplasia (status) no banco de dados. A presença dos marcadores foi testada em:

1. Linfonodos portadores de neoplasia, nominados LN1+.
2. Linfonodos sem neoplasia de portadores de linfonodos metastáticos (linfonodos negativos da linfadenectomia regional com linfonodo sentinela positivo), nominados LN1-.
3. Linfonodos sem neoplasia de pacientes não portadores de metástases linfonodais, nominados LN0.

Para testar a associação entre a frequência de alterações moleculares e os diferentes grupos de tumores em estudo, foi utilizado o teste de χ^2 ou teste exato de Fisher. Para a comparação das variáveis contínuas entre os grupos foi utilizado o teste T de Student e para análise de mais de dois grupos, o teste de ANOVA. As associações das variáveis à sobrevida global específica por câncer e livre de doença foram avaliadas por meio de construção de curvas de sobrevida estimadas com o método de Kaplan Meier e com o teste de log-rank para avaliar diferenças entre as curvas. Para associações das imunomarcações e sobrevivência, como o mesmo grupo de pacientes com metástase no linfonodo sentinela foram testados duplamente (no linfonodo sentinela positivo e no linfonodo sentinela negativo da mesma base linfonodal), o dado utilizado foi o obtido do linfonodo sentinela. Análises múltiplas foram realizadas com o método de regressão de Cox para variáveis que foram significantes na análise simples ou consideradas de ajuste no modelo múltiplo. Em todos os testes o nível de significância adotado foi de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS para Windows, versão 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4 RESULTADOS

4.1 População do estudo

Foram incluídos no estudo 103 pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo e submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela. Todos os prontuários foram revisados para estabelecimento do estágio patológico e as informações demográficas, clínicas, histopatológicas, de tratamento e seguimento dos pacientes quanto ao status atual atualizados até a data de dezembro de 2015.

A média de idade foi de 55,2 anos, dos quais 42 pacientes (40,8%) eram do sexo masculino e 61 (59,2%) do sexo feminino. A cor de pele branca foi a mais prevalente, com 89,3% dos casos. A Tabela 7 resume as características demográficas dos pacientes.

Tabela 7 - Características demográficas dos 103 portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela no Hospital de Câncer de Barretos.

Características (103 pacientes)	N (%)
Sexo	
Masculino	42 (40,8)
Feminino	61 (59,2)
Cor da pele	
Branca	92 (89,3)
Não branca	11 (10,7)
Idade ao diagnóstico	
Maior ou igual a 20 e menor que 41 anos	19 (16,4)
Maior ou igual a 41 e menor que 61 anos	57 (49,1)
Maior ou igual a 61 anos	40 (34,5)
Procedência	
GO	10 (9,7)
MG	13 (12,7)
MS	3 (2,9)
MT	1 (1,0)
RO	5 (4,9)

Tabela 7 - Características demográficas dos 103 portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela no Hospital de Câncer de Barretos.

Características (103 pacientes)	N (%)
SP	71 (68,9)
Exposição frequente ao sol	
Não	23 (22,3)
Atualmente sim	68 (66,0)
Atualmente não	7 (6,8)
Ignorado	5 (4,9)

Mais de 90% dos pacientes eram de zona urbana, e apenas 10 (9,8%) moravam na zona rural.

A média de idade ao diagnóstico foi de 55,22 anos e a mediana de 55,23 anos.

Todos os pacientes apresentavam apenas doença locorregional à admissão.

Em relação à excisão do tumor primário, foi realizada biópsia incisional de 25 (25%) dos casos, biópsia excisional em 70 (70%) e exérese sem margem adequada em 5 (5%) dos tumores.

A Tabela 8 resume as características clínicas, histopatológicas e relacionadas ao tratamento dos pacientes.

Tabela 8 - Características clínicas, histopatológicas e relacionadas ao tratamento dos 103 pacientes estudados em portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela no Hospital de Câncer de Barretos.

Características	N (%)
Local da lesão primária à admissão	
Cabeça e pescoço	10 (9,7)
Tronco/genital	25 (24,2)
Membro superior	15 (14,5)
Membro inferior	53 (51,4)
Tipo histológico do tumor primário	
Acrolentiginoso	18 (17,6)

Tabela 8 - Características clínicas, histopatológicas e relacionadas ao tratamento dos 103 pacientes estudados em portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela no Hospital de Câncer de Barretos.

Características	N (%)
Nodular	40 (39,2)
Disseminativo superficial	38 (37,3)
Não classificável	2 (2,0)
In situ	1 (1,0)
Fusocelular	2 (2,0)
Nodular e disseminativo superficial	1 (1,0)
Clark	
I	1 (1,1)
II	5 (5,3)
III	28 (29,5)
IV	45 (47,4)
V	16 (16,8)
Breslow	
Até 1,00 mm	16 (14,4)
1,01 a 2,00 mm	26 (23,4)
2,01 a 4,00 mm	36 (32,4)
Maior que 4,00mm	33 (29,7)
Ulceração	
Sim	51 (53,1)
Não	45 (46,9)
Regressão	
Sim	5 (5,6)
Não	84 (94,4)
Estadio Patológico	
0	1 (1,0)
1	14 (13,6)
2	24 (23,3)

Tabela 8 - Características clínicas, histopatológicas e relacionadas ao tratamento dos 103 pacientes estudados em portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela no Hospital de Câncer de Barretos.

Características	N (%)
3	63 (61,2)
X	1 (1,0)
Situação atual do paciente	
Vivo sem doença	57 (55,3)
Vivo com doença	8 (7,8)
Morto por melanoma	35 (34,0)
Morto por outras causa	3 (2,9)

A média da espessura de Breslow encontrada foi de 4,23 e a mediana 2,8mm.

Na evolução dos casos, ocorreu recidiva locorregional em 24 (23,3%) pacientes (Tabela 9). Analisando o grupo de pacientes com linfonodo sentinela negativos (40 casos), houve recidiva linfonodal na cadeia do sentinela negativo em 3 pacientes (7,5%) e 6 casos de recidiva linfonodal distante, em trânsito ou metástases à distância.

Tabela 9 - Características da localização da recidiva locorregional no grupo de pacientes estudados.

Local da recidiva locorregional	N (%)
Em trânsito	9 (37,5)
Linfonodal distante	5 (20,8)
Plantar	1 (4,2)
Linfonodal na cadeia do LS negativo	9 (37,%)

4.2 Características dos linfonodos estudados

Os blocos de parafina foram aproveitados em sua maioria, porém alguns casos apresentaram material insatisfatório para o estudo e houve variação no número de casos estudados para cada marcador. A Tabela 10 demonstra o número de casos em que foram realizados o estudo imuno-histoquímico e de acordo com cada marcador.

Tabela 10 - Número de linfonodos estudados para cada grupo e de acordo com cada marcador.

Grupo	N	PD-1	VEGF-C	VEGF-A	PDL-1
LN0	40	38	39	35	N/A*
LN1+	38	35	38	36	28
LN1-	38	38	38	38	N/A*

*N/A: não se aplica

4.3 Frequência de imunoexpressão dos marcadores

Os resultados dos testes de imunoexpressão dos marcadores de interesse PD-1, VEGF-C e VEGF-A de acordo com os grupos de linfonodos sentinelas negativos, positivos e linfonodos negativos provenientes de base linfonodal com ao menos um linfonodo sentinela positivo e a localização de expressão nos linfonodos, são demonstrados nas Tabelas de 11 a 16.

Tabela 11 - Frequência de imunoexpressão de PD1 nos linfonodos sentinelas (LS) e regionais de acordo com a presença ou não de metástases em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

PD1	LN0	LN1-	LN1+
Positivo	19 (50%)	10 (26,3%)	23 (65,7%)
Negativo	19 (50%)	28 (73,6%)	12 (42,8%)
Total	38 (100%)	38 (100%)	35 (100%)

p=0,04

Tabela 12 - Frequência de imunoexpressão de PD1 conforme a localização nos linfonodos sentinelas (LS) e regionais de acordo com a presença ou não de metástases em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Padrão do PD1	LN0	LN1-	LN1+
Positivo			
Células centrofoliculares	19 (100%)	10 (100%)	6 (26%)
Linfócitos intra e peri tumorais	0	0	17 (73,9%)
Total	19 (100%)	10 (100%)	23 (100%)

p= 0,8

Tabela 13 - Frequência de imunoexpressão de VEGF-C nos linfonodos sentinelas (LS) e regionais de acordo com a presença ou não de metástases em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

VEGFC	LN0	LN1-	LN1+
Positivo	27 (69,2%)	20 (52,6%)	32 (84,2%)
Negativo	12 (30,8%)	18 (47,3%)	6 (15,8%)
Total	39 (100%)	38 (100%)	35 (100%)

p= 0,012

Tabela 14 - Frequência de imunoexpressão de VEGF-C conforme a localização nos linfonodos sentinelas (LS) e regionais de acordo com a presença ou não de metástases em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Padrão do VEGF-C	LN0	LN1-	LN1+
Positivo			
Macrófagos	24 (88,9%)	20 (100%)	8 (25,0%)
Ambiente	3 (11,1%)	0	0
Célula tumoral	0	0	24 (75,0%)
Total	27 (100%)	20 (100%)	32 (100%)

p=0,035

Tabela 15 - Frequência de imunoexpressão de VEGF-A nos linfonodos sentinelas (LS) e regionais de acordo com a presença ou não de metástases em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

VEGF-A	LNO	LN1-	LN1+
Positivo	8 (22,9%)	13 (34,2%)	29 (80,6%)
Negativo	27 (77,1%)	25 (65,7%)	7 (19,4%)
Total	35 (100%)	38 (100%)	36 (100%)

p<0,001

Tabela 16 - Frequência de imunoexpressão de VEGF-A conforme a localização nos linfonodos sentinela (LS) e regionais de acordo com a presença ou não de metástases em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Padrão do VEGF-A	LNO	LN1-	LN1+
Positivo			
Macrófagos	7 (87,5%)	13 (100%)	3 (10,3%)
Célula tumoral	0	0	26 (89,7%)
Linfócitos	1 (12,5%)	0	0
Total	8 (100%)	13 (100%)	29 (100%)

p<0,001

Foram realizados testes de associação entre os marcadores PD-1, PDL-1, VEGF-C e VEGF-A em relação a cor, sexo, exposição ao sol, local da lesão à admissão primária, Clark, tipo histológico, infiltrado inflamatório peri e intratumoral, invasão vascular linfática e sanguínea, invasão perineural, ulceração, regressão, satelitose, Breslow, recidiva locorregional, idade ao diagnóstico que não evidenciaram diferença estatisticamente significativa entre eles (Tabelas 17 e 18). O estágio clínico patológico mais avançado foi associado a uma maior imunoexpressão em todos os marcadores estudados (Tabela 19).

Tabela 17 - Análise de fatores demográficos e clínicos em relação à frequência da expressão dos marcadores PD1, VEGF-C e VEGF-A nos pacientes de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela do Hospital de Câncer de Barretos.

Características clínicas e demográficas		Marcadores moleculares														
		PD1				VEGF C				VEGF A						
		Negativo (%)		Positivo (%)		Negativo (%)		Positivo (%)		Negativo (%)		Positivo (%)				
Cor	Branca	27	93,1%	75	91,5%		34	94.4%	71	89.9%		54	91.5%	46	92.0%	
	Não branca	2	6,8%	7	8,5%	p=0,32	2	5.6%	8	10.1%	p= 0,26	5	8.5%	4	8.0%	p=0,45
Sexo	Masculino	14	48,3%	30	36,6%		12	33.3%	35	44.3%		21	35.6%	23	46.0%	
	Feminino	15	51,7%	52	63,4%	p=0,26	24	66.7%	44	55.7%	p=0,34	38	64.4%	27	54.0%	p=0,34
Exposicao frequente ao sol	Não	7	25,9%	22	27,8%		5	14.7%	24	31.6%		17	30.4%	10	20.8%	
	Atualmente não	0	0%	8	10,1%		1	2.9%	7	9.2%		4	7.1%	4	8.3%	
	Atualmente sim	20	74,1%	49	62.0%	p=0,20	28	82.4%	45	59.2%	p=0,08	35	62.5%	34	70.8%	p=0,47
Local da lesao à admissao	Cabeça e pescoço	5	8.5%	7	13.5%		2	5.6%	10	12.7%		8	13.6%	4	8.0%	
primária	Tronco/Genital	18	30.5%	10	19.2%		6	16.7%	23	29.1%		12	20.3%	15	30.0%	
	Membro superior	8	13.6%	8	15.4%		7	19.4%	10	12.7%		10	16.9%	6	12.0%	
	Membro inferior	28	47.5%	27	51.9%	p=0,86	21	58.3%	36	45.6%	p=0,65	29	49.2%	25	50.0%	p= 0,41
Idade ao diagnostico	até 20 anos	0	0.0%	0	0.0%		0	0.0%	0	0.0%		0	0.0%	0	0.0%	
	>20 e < 41 anos	8	13.6%	11	21.2%		4	11.1%	15	19.0%		9	15.3%	9	18.0%	
	>=41 e <61 anos	33	55.9%	21	40.4%		18	50.0%	38	48.1%		28	47.5%	25	50.0%	
	maior ou igual a 61 anos	18	30.5%	20	38.5%	p=0,75	14	38.9%	26	32.9%	p=0,65	22	37.3%	16	32.0%	p= 0,61

Tabela 18 - Análise de fatores histopatológicos em relação à frequência da expressão dos marcadores PD1, VEGF-C e VEGF-A nos pacientes de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Características clínicas e demográficas		Marcadores moleculares											
		PD1				VEGF C				VEGF A			
		Negativo (%)		Positivo (%)		Negativo (%)		Positivo (%)		Negativo (%)		Positivo (%)	
Tipo histológico	Acrolentiginoso	5	17,2%	12	14,8%	6	17.1%	12	15.8%	10	17.5%	6	12.5%
	Nodular	12	41,4%	34	42%	16	45.7%	30	39.5%	23	40.4%	23	47.9%
	Disseminativo superficial	8	47,6%	33	40,7%	12	34.3%	32	42.1%	23	40.4%	17	35.4%
	IN SITU	1	1.8%	0	0.0%	1	2.9%	0	0.0%	1	1.8%	0	0.0%
	Fusocelular	2	3.6%	1	1,8%	0	0.0%	2	2.6%	0	0.0%	2	4.2%
Fase de crescimento	Radial	3	13,6%	9	11,5%	3	10.0%	9	12.2%	6	11.1%	5	11.4%
	Vertical	16	72,7%	66	84,6%	24	80.0%	61	82.4%	43	79.6%	37	84.1%
	Radial e vertical	3	13,6%	3	3.8%	3	10.0%	4	5.4%	5	9.3%	2	4.5%
Infiltrado inflamatório	Sim	11	55%	28	37,8 %	14	51.9%	28	39.4%	22	40.7%	18	47.4%
linfocitário peritumoral	Não	9	45%	46	62,2% p=0,16	13	48.1%	43	60.6% p=0,18	32	59.3%	20	52.6% p=0,65
Infiltrado inflamatório	Sim	12	60%	39	50,6%	13	46.4%	39	53.4%	29	53.7%	21	51.2%
linfocitário intratumoral	Não	8	40%	38	49.4% p=0,46	15	53.6%	34	46.6% p=0,82	25	46.3%	20	48.8% p=0,64
Invasão vascular linfática e	Sim	0	0%	3	4.1%	1	4.0%	2	2.8%	2	3.9%	1	2.5%
sanguínea	Não	20	100%	71	95.9% p=0,57	24	96.0%	70	97.2% p=0,72	49	96.1%	39	97.5% p=0,67
Invasão perineural	Sim	2	10,5%	5	6,8%	3	13.0%	4	5.6%	4	8.2%	3	7.5%
	Não	17	89,5%	68	93.2% p=0,63	20	87.0%	68	94.4% p=0,34	45	91.8%	37	92.5% p=0,85
Úlceracao	Sim	12	52,2%	40	49,4%	19	59.4%	36	47.4%	28	50.0%	24	52.2%
	Não	11	47,8%	41	50,6% p=0,81	13	40.6%	40	52.6% p=0,17	28	50.0%	22	47.8% p=0,98
Regressão	Sim	1	5,0%	4	5,2%	1	3.6%	5	6.8%	3	5.6%	2	4.9%

Tabela 18 - Análise de fatores histopatológicos em relação à frequência da expressão dos marcadores PD1, VEGF-C e VEGF-A nos pacientes de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Características clínicas e demográficas		Marcadores moleculares														
		PD1						VEGF C						VEGF A		
		Negativo (%)		Positivo (%)			Negativo (%)		Positivo (%)			Negativo (%)		Positivo (%)		
	Não	19	95%	73	94,8%	p=0,97	27	96.4%	68	93.2%	p=0,68	51	94.4%	39	95.1%	p=0,84
Sateliteose microscopica	Sim	1	5,0%	6	7.8%		3	10.7%	4	5.5%		4	7.4%	3	7.3%	
	Não	19	95.0%	71	92.2%	p=0,66	25	89.3%	69	94.5%	p=0,38	50	92.6%	38	92.7%	p=0,94
Recidiva locorregional	Não	20	69.0%	67	81,7%		29	80.6%	60	75.9%		47	79.7%	38	76.0%	
	Sim	9	31.0%	15	18,3%	p=0,15	7	19.4%	19	24.1%	p=0,65	12	20.3%	12	24.0%	p=0,72
Breslow	Até 1 mm	11	20.4%	5	9.6%		4	12.1%	12	15.6%		11	19.6%	4	8.3%	
	1,01 a 2 mm	14	25.9%	11	21.2%		11	33.3%	15	19.5%		12	21.4%	13	27.1%	
	2,01 a 4,00 mm	17	31.5%	16	30.8%		9	27.3%	26	33.8%		17	30.4%	16	33.3%	
	maior que 4 mm	12	22.2%	20	38.5%	p=0,68	9	27.3%	24	31.2%	p=0,56	16	28.6%	15	31.2%	p=0,42

Tabela 19 - Frequência de imunoexpressão do PD-1, VEGF-C e VEGF-A em relação ao Estadiamento Clínico nas três principais categorias analisados por linfonodo individualmente.

	Estádio Clínico I	Estádio Clínico II	Estádio Clínico III
PD1			
Positivo	4 (7,7%)	15 (28,8%)	33 (63,5%)
Negativo	10 (17,5%)	7 (12,3%)	40 (70,2%)
			p=0,036
VEGF-C			
Positivo	11 (13,9%)	16 (20,3%)	52 (65,8%)
Negativo	3 (8,8%)	7 (20,6%)	24 (70,6%)
			p= 0,039
VEGF-A			
Positivo	3 (6,0%)	5 (10,0%)	42 (84,0%)
Negativo	9 (15,8%)	16 (28,1%)	32 (56,1%)
			p=0,038

O marcador PDL-1 foi testado somente no grupo de linfonodos sentinelas positivos, visto que é encontrado em sua maioria na membrana de células tumorais. Dos 38 linfonodos sentinelas positivos, foi possível a realização de lâminas para estudo imuno-histoquímico para PDL-1 em 29 casos. Os achados estão na Tabela 20.

Tabela 20 - Frequência de imunoexpressão de PDL-1 no grupo de linfonodos sentinelas positivos e sua localização em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

PDL1	Linfonodo Sentinela Positivo N(%)
Negativo	11 (39,3)
Positivo	17 (60,7)
Citoplasmático	12 (70,6)
Membrana e citoplasma	5 (29,4)

4.4 Detecção da imunoexpressão:

A imunoexpressão, de acordo com cada marcador estudado, é demonstrada através de microfotografias (Figuras 1 a 5). As imunorreações são evidentes em cor castanho ferruginosa. A intensidade pode ser nitidamente observada por alterações de matiz. Nas figuras com maior aumento, é possível identificar a marcação de citoplasma e de membrana.

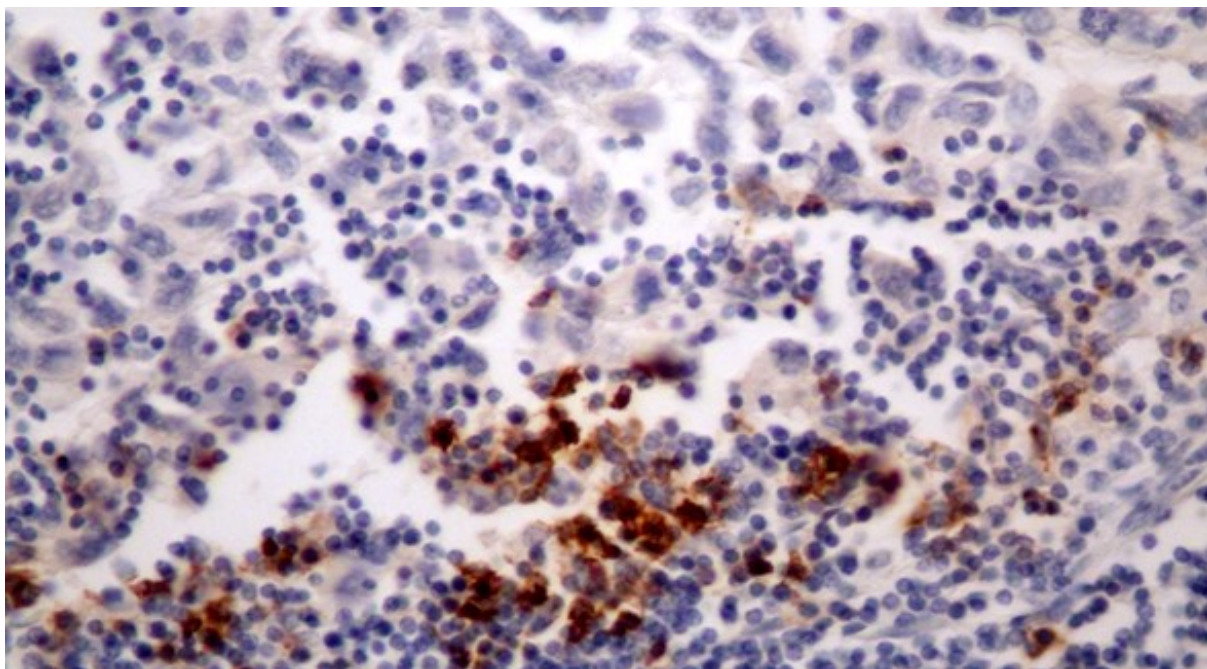


Figura 1 - Imagem representativa de coloração imuno-histoquímica para detecção de PD1 em linfonodo sentinela positivo na periferia do tumor. Magnificação original = 400 vezes.

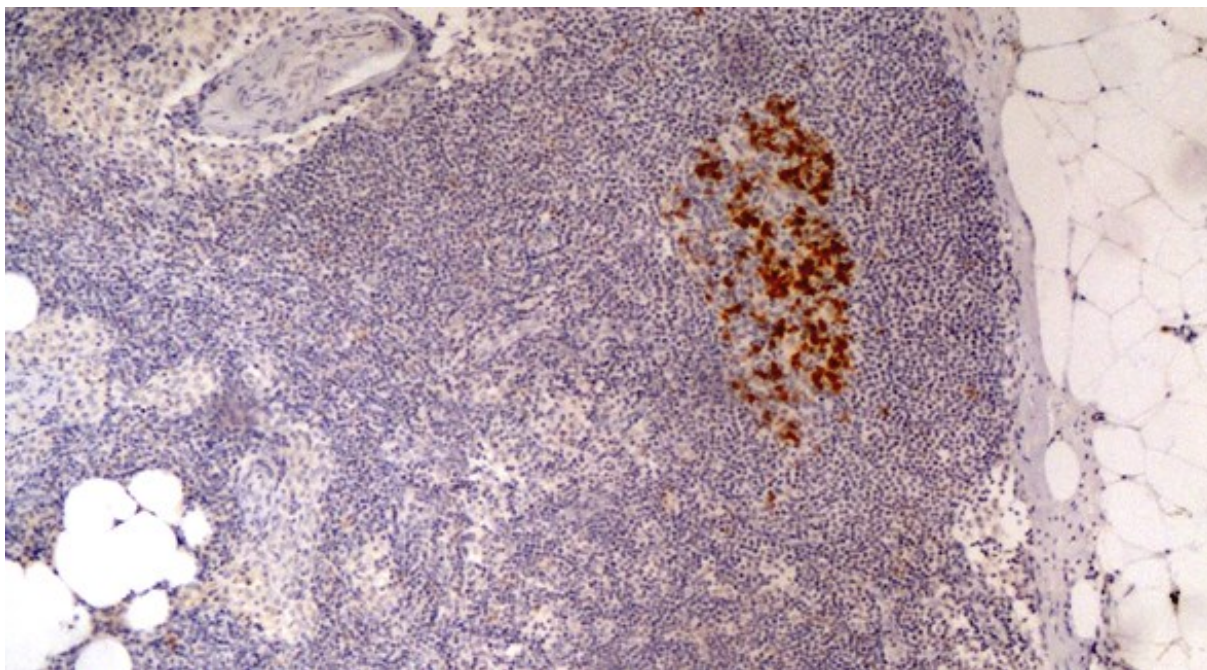


Figura 2 - Imagem representativa de coloração imuno-histoquímica para detecção de PD1 em linfonodo sentinela negativo com centro germinativo expressando células T. Magnificação original = 100 vezes.

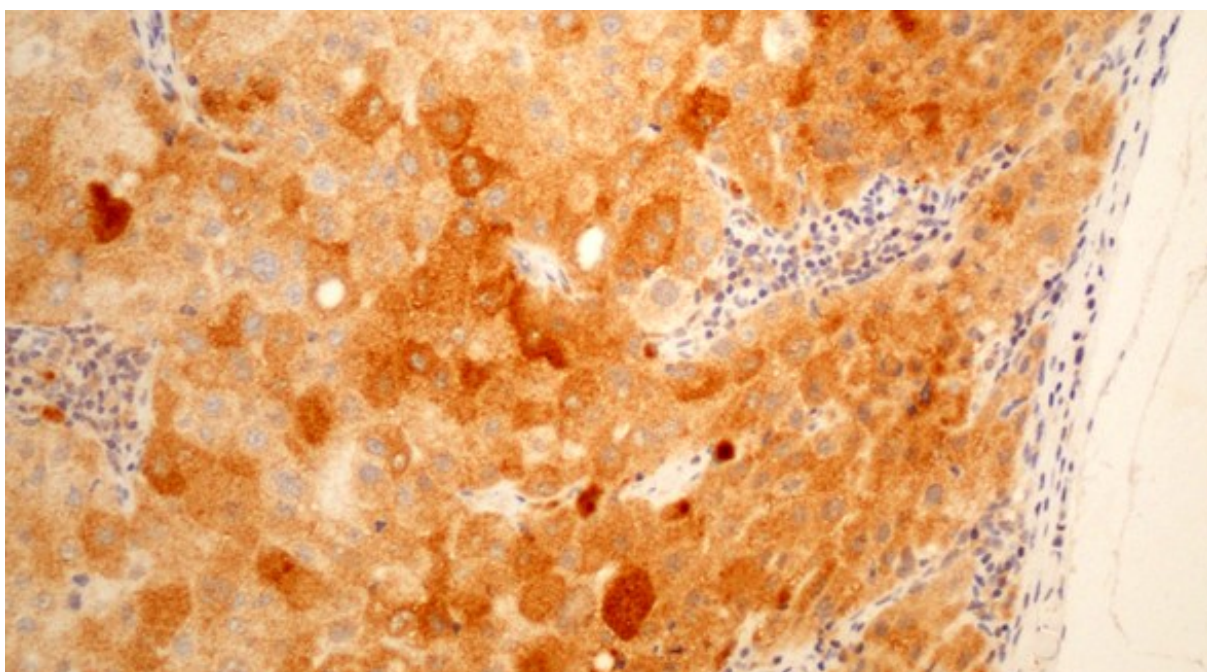


Figura 3 - Imagem representativa de coloração imuno-histoquímica para detecção de PDL1 em linfonodo sentinela positivo, imunomarcagem no citoplasma das células tumorais. Magnificação original = 200 vezes.

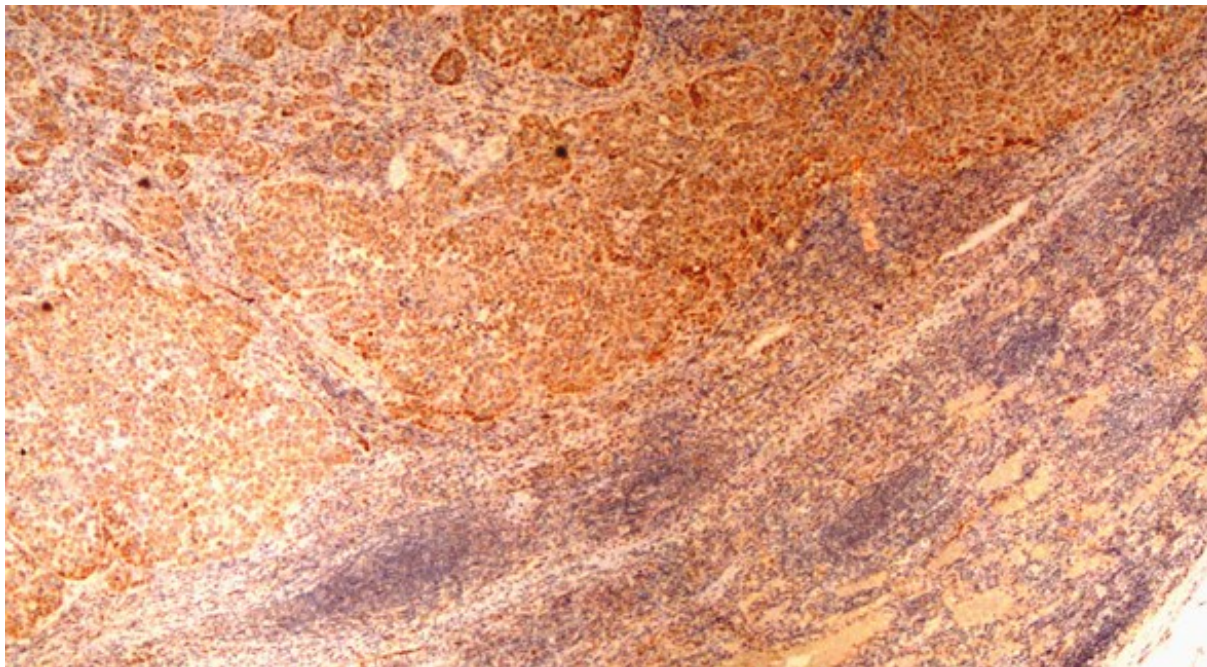


Figura 4 - Imagem representativa de coloração imuno-histoquímica para detecção de VEGF-C em linfonodo sentinela positivo, imunomarcação na membrana das células tumorais. Magnificação original = 40 vezes.

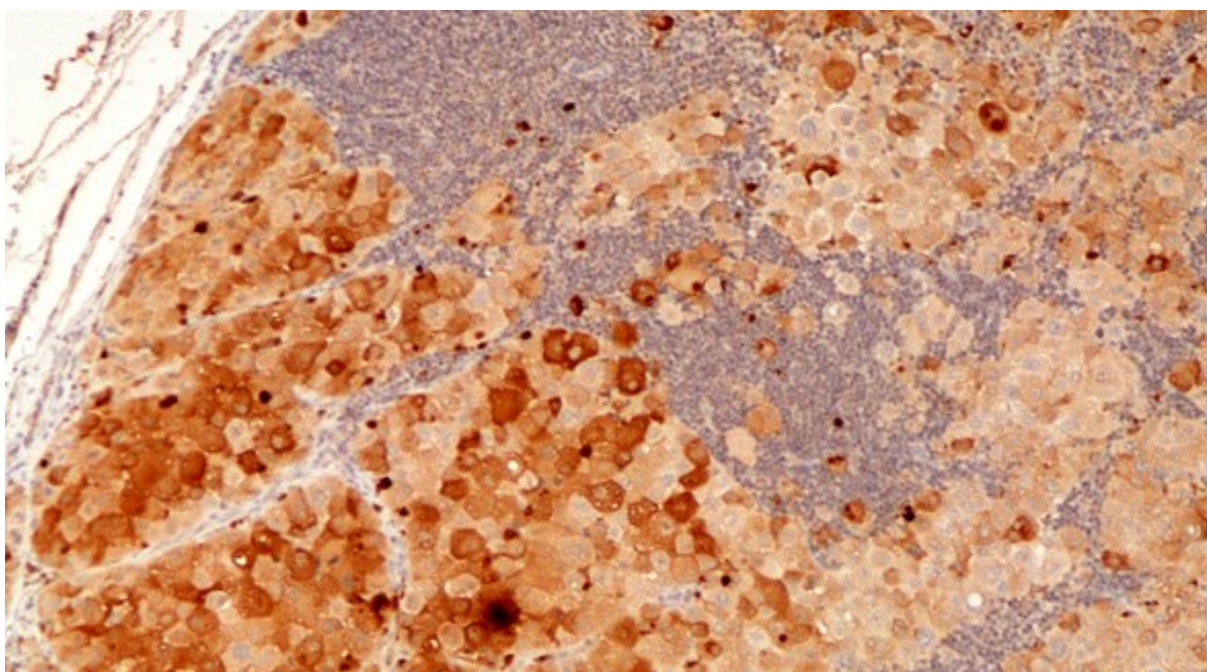


Figura 5 - Imagem representativa de coloração imuno-histoquímica para detecção de VEGF-A em linfonodo sentinela positivo, imunomarcação na membrana e citoplasma das células tumorais. Magnificação original = 100 vezes

4.5 Análise de sobrevida global e sobrevida livre de doença

A sobrevida global de toda a amostra foi de 61,8% em 5 anos, com sobrevida média de 93 meses P 6,8 e mediana de 140 meses (DP 54) (Figura 6). Já a sobrevida livre de doença foi de 55,8% em 5 anos com sobrevida média de 81 meses (DP 7,1) e mediana de 84 meses (DP 25) (Figura 7). Em relação à sobrevida específica por melanoma, foi encontrado 63,3% em 5 anos, com sobrevida média de 98 meses (DP 6,7) e mediana de 140 meses (DP 45) (Figura 8).

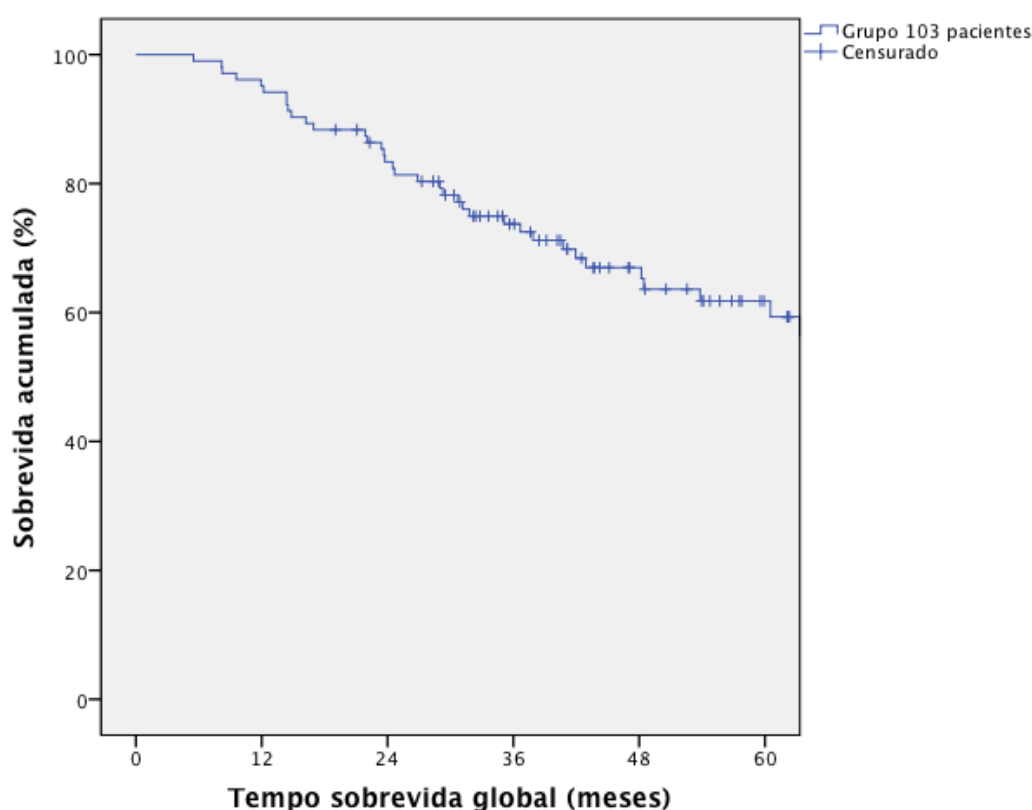


Figura 6 - Curva de sobrevida global do grupo de 103 pacientes portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa do linfonodo sentinela do Hospital de Câncer de Barretos.

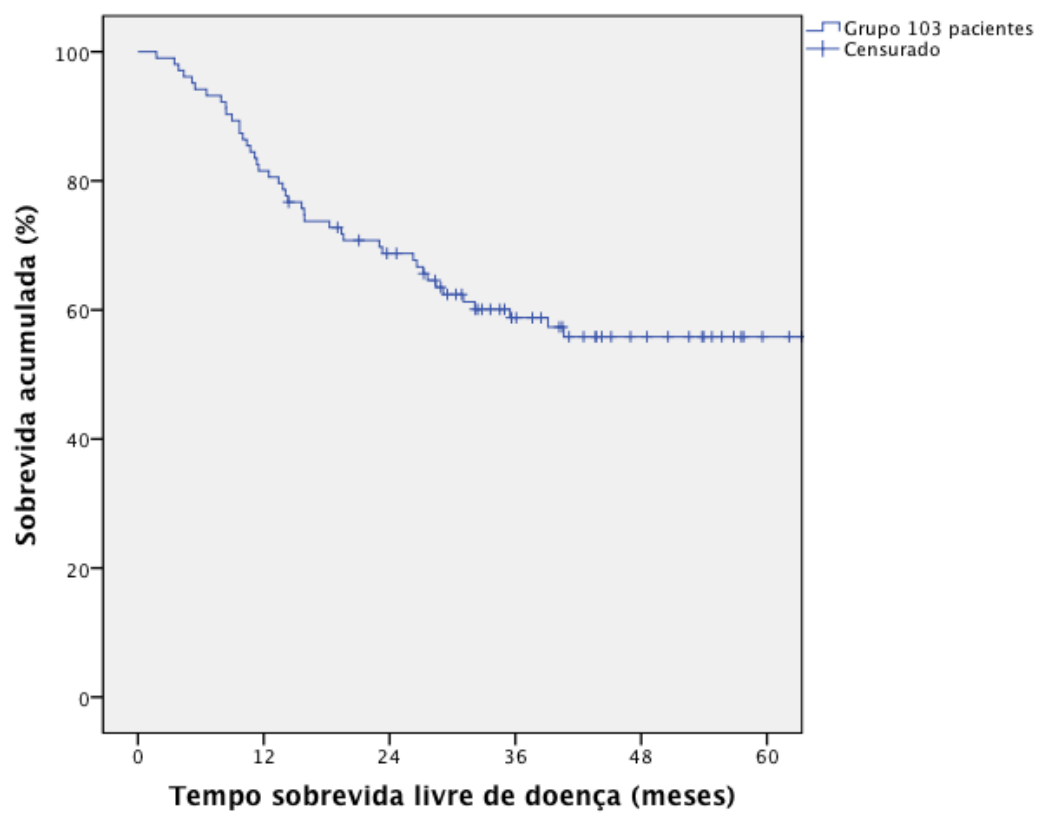


Figura 7 - Curva de sobrevida livre de doença do grupo de 103 pacientes portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa do linfonodo sentinela do Hospital de Câncer de Barretos.

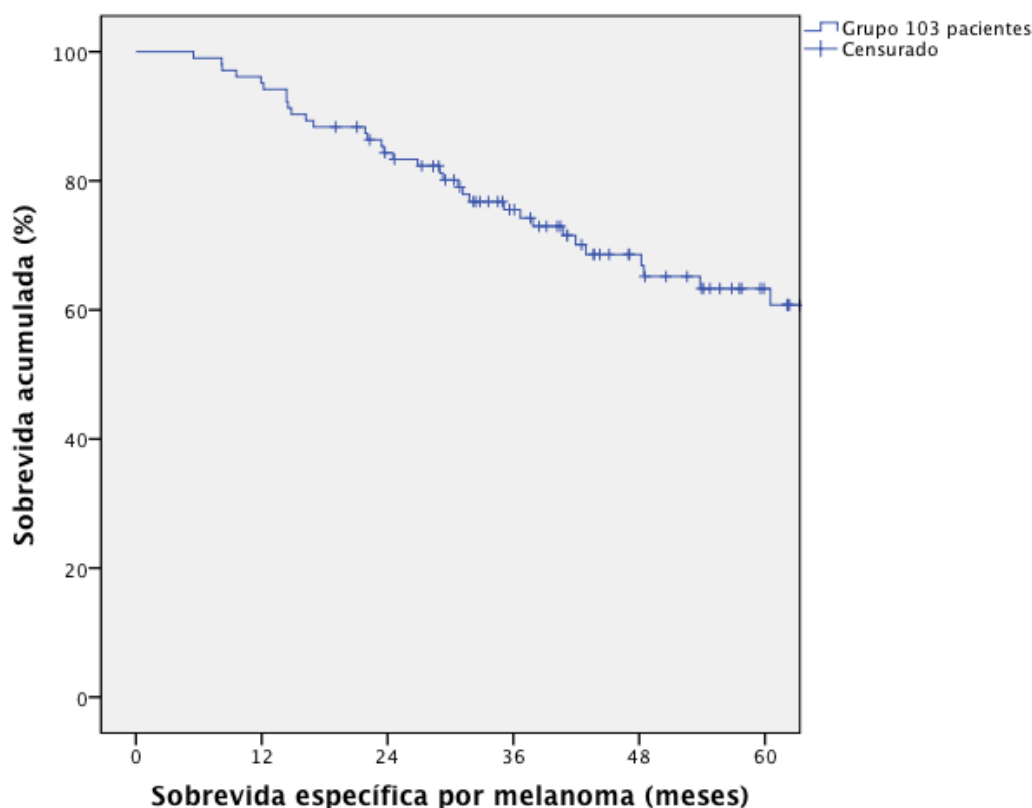


Figura 8 – Curva de sobrevida específica por melanoma do grupo de 103 pacientes portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa do linfonodo sentinela do Hospital de Câncer de Barretos.

Ao compararmos os portadores de metástases linfonodais com os livres de metástases, foram observadas diferentes curvas e valores, tanto para a sobrevida global quanto para a sobrevida livre de doença. A sobrevida global para os portadores de metástases foi de 44% em 5 anos, com sobrevida média de 72 meses (DP 9,2) e mediana de 42 meses (DP 8,3). A sobrevida global para os pacientes livres de metástases foi de 87,7% em 5 anos, com sobrevida média de 119 meses (DP 10,5) e mediana de 140 meses (DP 45), com valor de p de 0,002 (Figuras 6). Já a sobrevida livre de doença foi de 32,9% em 5 anos para os portadores de metástases linfonodais, com sobrevida média de 54 meses (DP 9,2) e mediana de 26 meses (DP 4,6). Os pacientes livres de metástases linfonodais estavam livres de doença em 5 anos em 76,8% dos casos, com sobrevida média de 112 meses (DP 10,3) e mediana de 116 meses (DP 48), com valor de $p < 0,001$ (Figura 7).

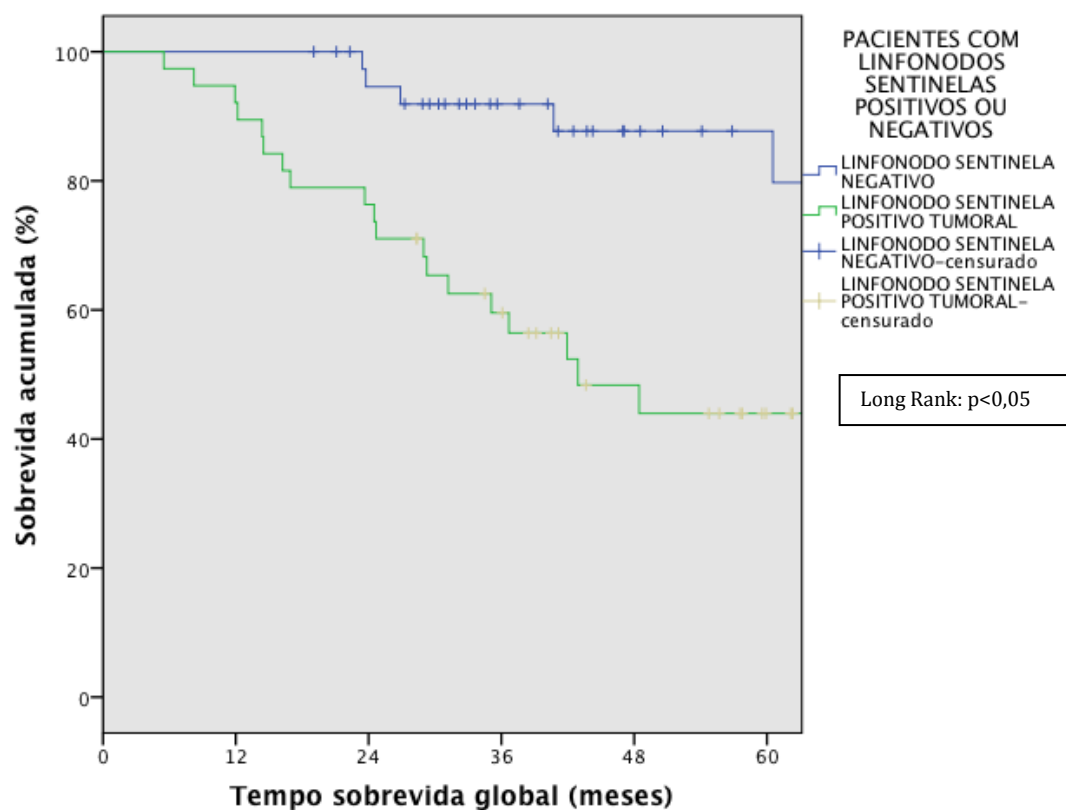


Figura 9 - Curva de sobrevida global de acordo com a presença de metástases linfonodais em portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa do linfonodo sentinela do Hospital de Câncer de Barretos.

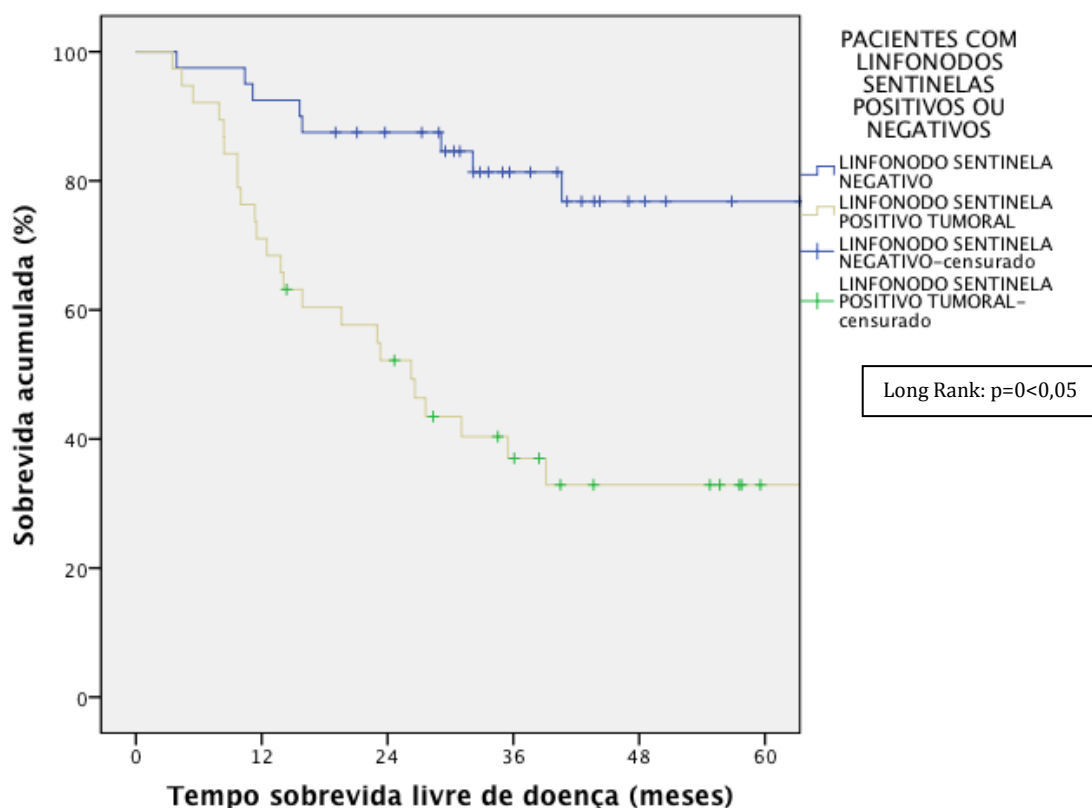


Figura 10 - Curva de sobrevida livre de doença de acordo com a presença de metástases linfonodais em portadores de melanoma cutâneo submetidos à pesquisa do linfonodo sentinela do Hospital de Câncer de Barretos.

Foram consideradas durante a análise de sobrevida global as variáveis relacionadas às demais características clínicas e histopatológicas entre todos os pacientes (Tabelas 21 e 22). Utilizando-se de análise de comparação das curvas de sobrevida global por 60 meses, verificou-se que houve diferença significativa entre os grupos em relação à cor da pele, idade ao diagnóstico, espessura tumoral de Breslow, estágio clínico e recidiva locorregional.

Tabela 21 - Análise dos fatores demográficos e clínicos dos em relação à sobrevida global nos pacientes com melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Sobrevida Global	Casos (%)	Sobrevida em 60 meses (%)
Cor da pele		
Branca	105 (90,5)	64,4
Não branca	11 (9,5)	72,9 $p=0,001$

Tabela 21 - Análise dos fatores demográficos e clínicos dos em relação à sobrevida global nos pacientes com melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Sobrevida Global	Casos (%)	Sobrevida em 60 meses (%)
Sexo	48 (41,3)	62,1
Masculino	68 (58,6)	67,2 p=0,18
Feminino		
Exposição frequente ao sol		
Não	29 (26,1)	76,1
Atualmente não	8 (7,2)	75,0
Atualmente sim	74 (66,6)	56,2 p=0,188
Local da lesão à admissão		
Cabeça e pescoço	12 (10,3)	31,2
Tronco/genital	29 (25)	57,4
Membro superior	17 (14,6)	87,1
Membro inferior	58 (50)	67,7 p=0,96
Idade ao diagnóstico		
>20 e <41 anos	19 (16,3)	84,2
>=41 e <61 anos	57 (49,1)	64,9
maior ou igual a 61 anos	40 (34,4)	53,9 p=0,020

Tabela 22 - Análise dos fatores histopatológicos em relação à sobrevida global nos pacientes com melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Variável	Casos (%)	Sobrevida em 60 meses (%)
Tipo histológico		
Acrolentiginoso	19 (16,6)	27,9
Nodular	46 (40,3)	59,8
Disseminativo superficial	44 (38,5)	76,5
Não classificável	2 (1,7)	100,0
In situ	1 (0,8)	100,0
Fusocelular	2 (1,7)	50,0 p=0,335
Breslow		
Até 1mm	16 (14,40)	100
1,01 a 2 mm	26 (23,4)	76,5
2,01 a 4 mm	36 (32,4)	75,6
Maior que 4 mm	33 (29,7)	33,1 p=0,001
Clark		
I	1 (0,9)	100,0

Tabela 22 - Análise dos fatores histopatológicos em relação à sobrevida global nos pacientes com melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Variável	Casos (%)	Sobrevida em 60 meses (%)
II	6 (5,5)	100,0
III	33 (36,1)	84,2
IV	50 (46,2)	63,0
V	18 (16,6)	39,2 p=0,012
Fase de crescimento		
Radial	12 (11,4)	56,2
Vertical	86 (81,9)	72,8
Radial e vertical	7 (6,6)	42,9 p=0,494
Infiltrado inflamatório peritumoral		
Não	56 (56,5)	71,8
Sim	43 (43,4)	60,5 p=0,397
Infiltrado inflamatório intratumoral		
Não	49 (48)	68,0
Sim	53 (51,9)	62,3 p=0,873
Invasão vascular		
Não	95 (96,9)	62,6
Sim	3 (3,1)	100 p=0,255
Invasão perineural		
Não	88 (91,6)	63,7
Sim	8 (8,3)	65,6 p=0,719
Ulceração		
Não	54 (49,5)	68,1
Sim	55 (50,4)	63,0 p=0,897
Regressão		
Não	96 (94,2)	66,4
Sim	6 (5,8)	41,7 p=0,727
Sateliteose microscópica		
Não	95 (93,1)	68,1
Sim	7 (6,8)	42,9 p=0,327
Estadio Clínico		
EC I	14 (12,0)	100
EC II	24 (20,6)	83,7
EC III	76 (65,5)	54,7 p=0,009
Recidiva locorregional		
Não	90 (77,5)	76,6
Sim	26 (22,4)	31,8 p=0,001

Também foram realizadas análises de sobrevida livre de doença das variáveis relacionadas às características clínicas e histopatológicas entre todos os pacientes (Tabelas 23 e 24). Utilizando-se de análise de comparação das curvas de sobrevida livre de doença por 60 meses, verificou-se que houve diferença significativa entre os grupos em relação à cor, sexo, idade ao diagnóstico, Breslow, Clark, satelitose microscópica, estadió clínico e recidiva locorregional.

Tabela 23 - Análise dos fatores demográficos e clínicos em relação à sobrevida livre de doença nos pacientes com melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Variável	Casos (%)	Sobrevida em 60 meses (%)
Cor		
Branca	105 (90,5)	56,8
Não branca	11 (9,5)	66,7 p=0,019
Sexo		
Masculino	48 (41,3)	44,7
Feminino	68 (58,6)	64,8 p=0,02
Exposição frequente ao sol		
Não	29 (26,1)	71,0
Atualmente não	8 (7,2)	75,0
Atualmente sim	74 (66,6)	47,1 p=0,065
Local da lesão à admissão		
Cabeça e pescoço	12 (10,3)	38,9
Tronco/genital	29 (25)	68,2
Membro superior	17 (14,6)	81,9
Membro inferior	58 (50)	46,4 p=0,124
Idade ao diagnóstico		
>20 e <41 anos	19 (16,3)	88,0
>=41 e <61 anos	57 (49,1)	55,1
maior ou igual a 61 anos	40 (34,4)	45,8 p=0,027

Tabela 24 - Análise dos fatores histopatológicos em relação à sobrevida livre de doença em 60 meses nos pacientes com melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Sobrevida Global	Casos (%)	Sobrevida livre de doença (%)
Tipo histológico		
Acrolentiginoso	19 (16,6)	0
Nodular	46 (40,3)	53,1

Tabela 24 - Análise dos fatores histopatológicos em relação à sobrevida livre de doença em 60 meses nos pacientes com melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Sobrevida Global	Casos (%)	Sobrevida livre de doença (%)
Disseminativo superficial	44 (38,5)	75,3
Não classificável	2 (1,7)	100,0
In situ	1 (0,8)	100,0
Fusocelular	2 (1,7)	50,0 p=0,06
Breslow		
Até 1mm	16 (14,40)	78,8
1,01 a 2 mm	26 (23,4)	69,2
2,01 a 4 mm	36 (32,4)	63,6
Maior que 4 mm	33 (29,7)	30,2 p=0,001
Clark		
I	1 (0,9)	100,0
II	6 (5,5)	83,3
III	33 (36,1)	71,3
IV	50 (46,2)	59,0
V	18 (16,6)	12,7 p<0,001
Fase de crescimento		
Radial	12 (11,4)	33,3
Vertical	86 (81,9)	62,8
Radial e vertical	7 (6,6)	57,1 p=0,41
Infiltrado inflamatório peritumoral		
Não	56 (56,5)	61,4
Sim	43 (43,4)	56,4 p=0,66
Infiltrado inflamatório intratumoral		
Não	49 (48)	58,4
Sim	53 (51,9)	54,7 p=0,97
Invasão vascular		
Não	95 (96,9)	54,9
Sim	3 (3,1)	66,7 p=0,78
Invasão perineural		
Não	88 (91,6)	55,1
Sim	8 (8,3)	72,9 p=0,34
Ulceração		
Não	54 (49,5)	59,6
Sim	55 (50,4)	54,5 p=0,71
Regressão		
Não	96 (94,2)	57,0
Sim	6 (5,8)	60,0 p=0,60
Sateliteose microscópica		
Não	95 (93,1)	59,6

Tabela 24 - Análise dos fatores histopatológicos em relação à sobrevida livre de doença em 60 meses nos pacientes com melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Sobrevida Global	Casos (%)	Sobrevida livre de doença (%)
Sim	7 (6,8)	19,0 p=0,03
Estadio Clínico		
EC I	14 (12,0)	76,2
EC II	24 (20,6)	80,4
EC III	76 (65,5)	47,2 p=0,002
Recidiva locorregional		
Não	90 (77,5)	74,8
Sim	26 (22,4)	3,8 p=0,001

Entre os marcadores analisados, não houve diferença significativa nas curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença.

4.6 Sobrevida global e livre de doença de acordo com a imunorreação com os marcadores de interesse

4.6.1 PD1

As médias do tempo de sobrevida global para PD1 negativo e positivo foram respectivamente de 95,05 (DP 8,3) e 93,65 (DP 11,6) meses. A mediana foi de 140 meses (DP 61) para PD1 negativo e de 86,4 (DP 23) para PD1 positivo (Figura 8, Tabela 23).

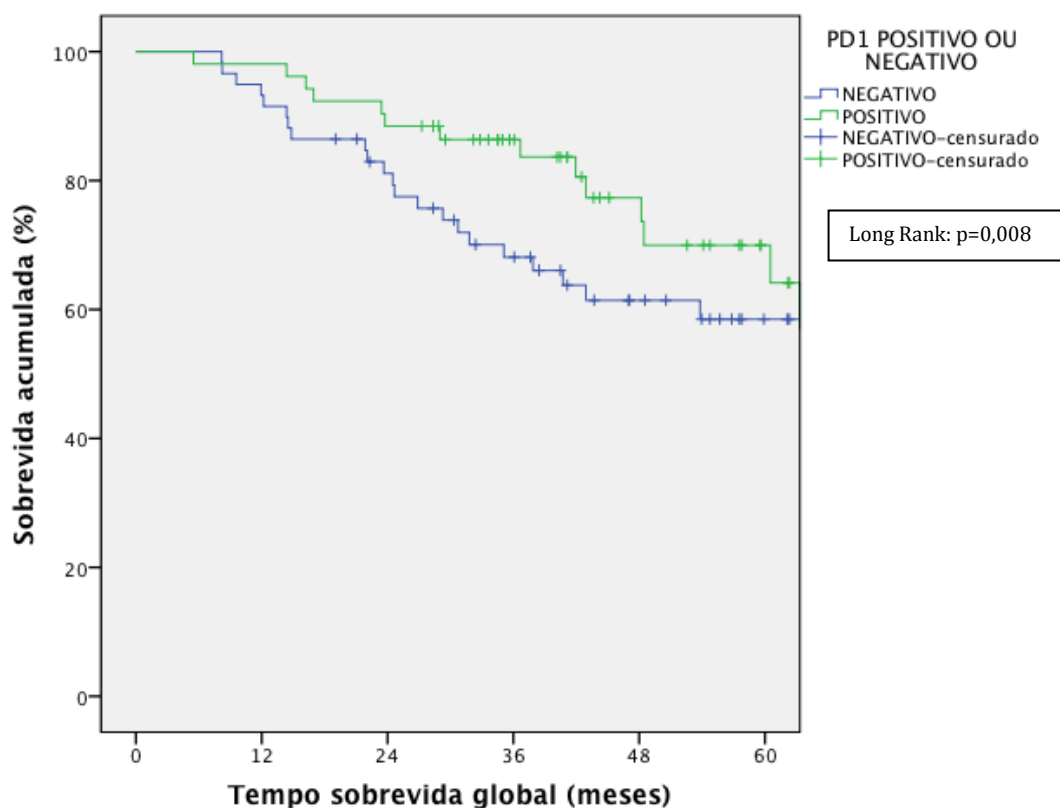


Figura 11 - Curva de sobrevida global de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para PD1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Tabela 25 - Sobrevida global em 1, 3 e 5 anos para PD1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

PD1	N	Eventos	1 ano	3 anos	5 anos
Negativo	59	23	93,2%	68,1%	48,2%
Positivo	52	15	98,1%	86,4%	71,5%

As médias do tempo de sobrevida livre de doença para PD1 positivo foram de 80,3 meses (DP 11) e negativo 81,13 meses (DP 9,9). A mediana foi de 83 meses para PD1 positivo (DP 22) e 116 meses para PD1 negativo (DP 62) (Figura 9, Tabela 24).

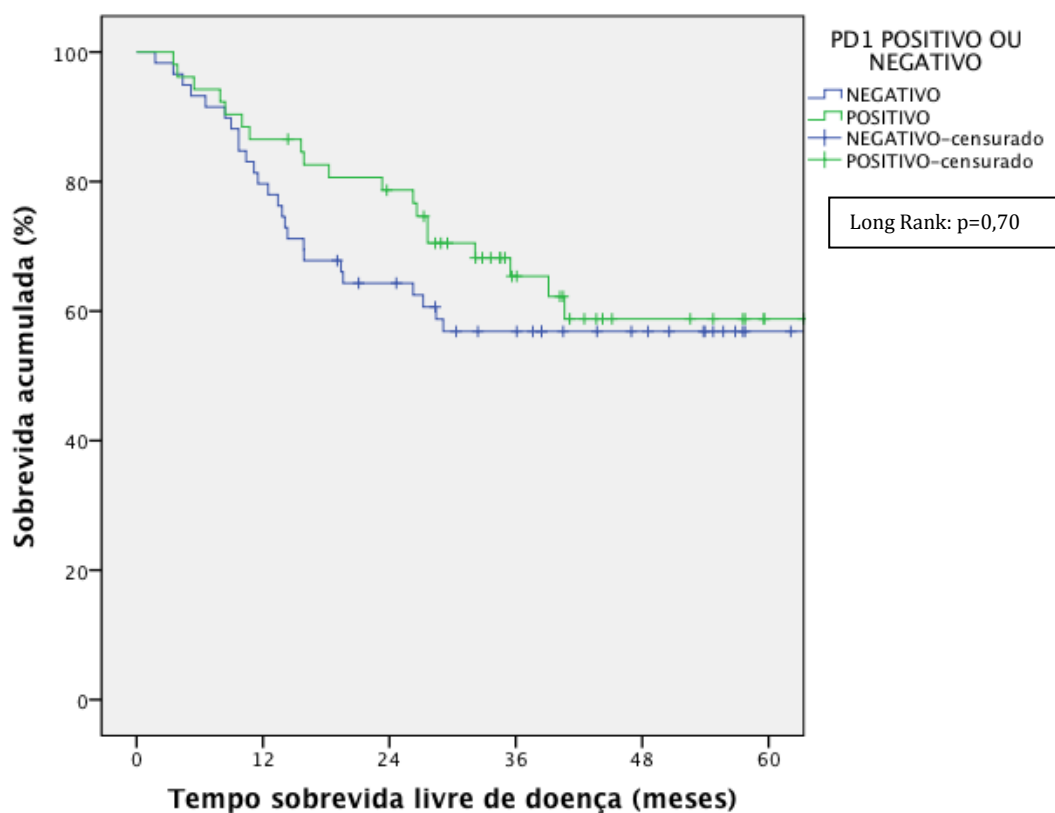


Figura 12 - Curva de sobrevida livre de doença de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para PD1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Tabela 26 - Sobrevida livre de doença em 1, 3 e 5 anos para PD1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

PD1	N	Eventos	1 ano	3 anos	5 anos
Negativo	59	26	79,7%	56,9%	56,9%
Positivo	52	22	86,5%	65,4%	58,8%

As médias do tempo de sobrevida específica por melanoma para PD1 positivo foram de 100,27 meses (DP 12) e negativo 96,73 meses (DP 8,3). A mediana foi de 86,48 para PD1 positivo (DP 45) e 140,03 meses para PD1 negativo (DP 61) (Figura 10, Tabela 25).

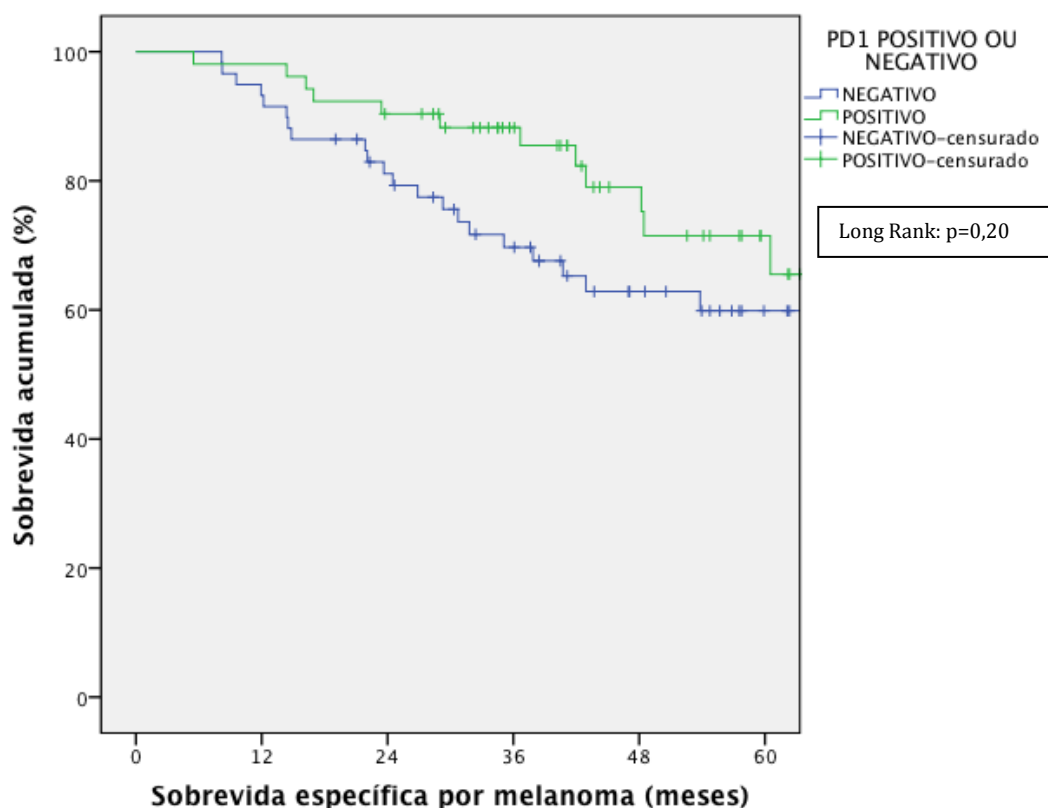


Figura 13 - Curva de tempo de sobrevida específica por melanoma de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para PD1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Tabela 27 - Sobrevida específica por melanoma em 1, 3 e 5 anos para PD1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

PD1	N	Eventos	1 ano	3 anos	5 anos
Negativo	59	22	93,2%	69,7%	59,9%
Positivo	52	13	98,1%	88,2%	71,5%

4.6.2 VEGF-C:

As médias do tempo de sobrevida global para VEGF-C positivo e negativo foram respectivamente de 99,3 (DP 7,9) e 94,51 meses (DP 10). A mediana foi de 86 para VEGF-C negativo (DP 45) e de 140 para VEGF-C positivo (DP 57) (Figura 11, Tabela 26).

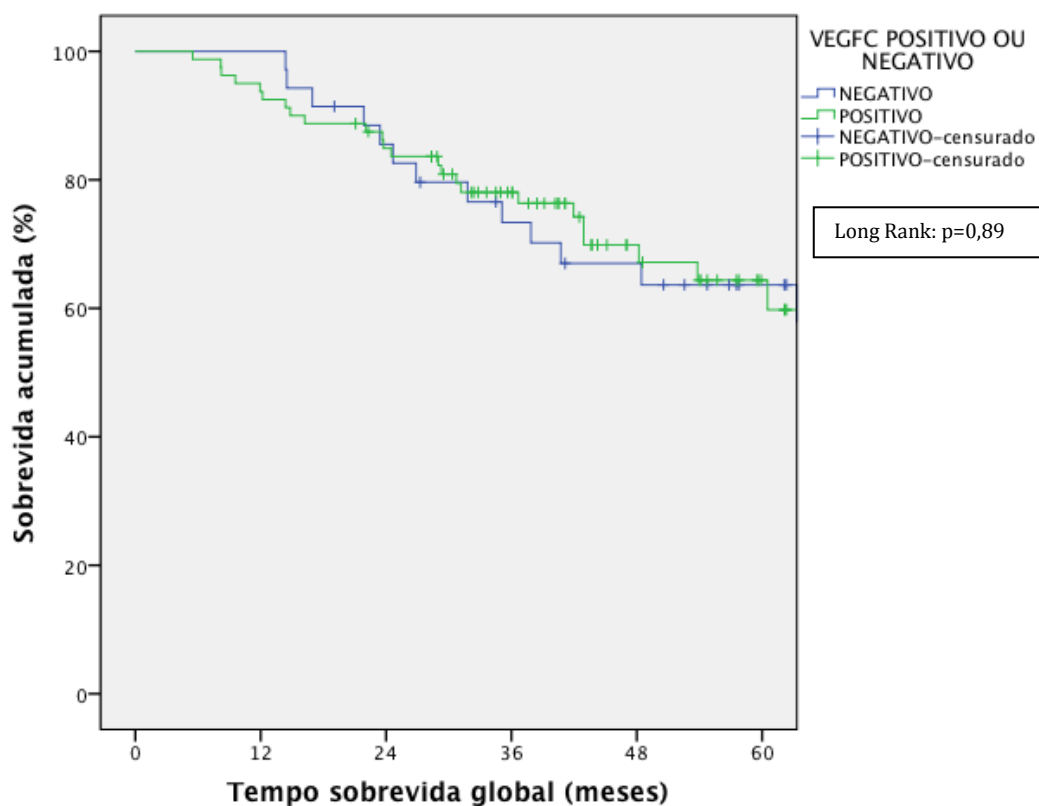


Figura 14 - Curva de sobrevida global de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para VEGF-C em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Tabela 28 - Tabela de sobrevida global em 1, 3 e 5 anos para VEGF-C em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

VEGF-C	N	Eventos	1 ano	3 anos	5 anos
Negativo	36	14	100%	73,4%	63,6%
Positivo	79	25	93,8%	78,0%	64,4%

As médias do tempo de sobrevida livre de doença para VEGF-C positivo foram de 81,09 meses (DP 8,4) e negativo 86,94 meses (DP 11,5). A mediana foi de 116 meses para VEGF-C positivo (DP 48) e 84 meses para VEGF-C negativo DP 24) (Figura 12, Tabela 27).

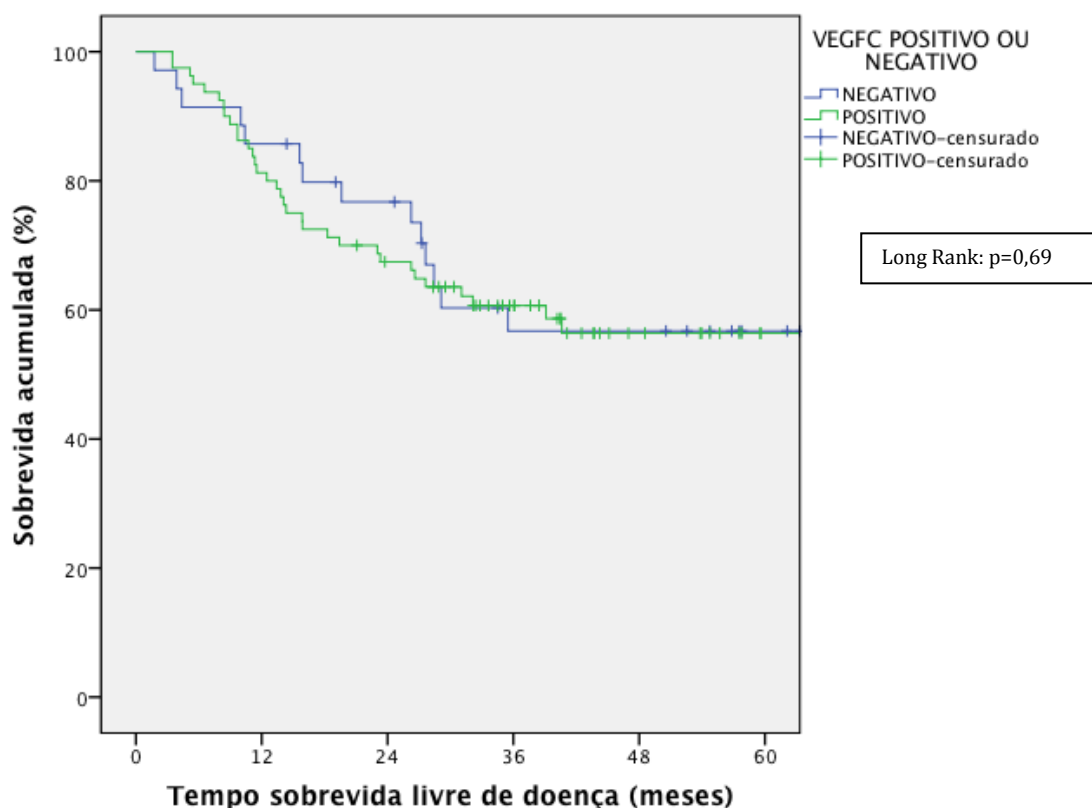


Figura 15 - Curva de sobrevida livre de doença de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para VEGF-C em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Tabela 29 - Sobrevida livre de doença em 1, 3 e 5 anos de acordo com a expressão de VEGF-C em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

VEGF-C	N	Eventos	1 ano	3 anos	5 anos
Negativo	36	15	85,7%	56,7%	56,7%
Positivo	79	36	81,3%	60,7%	56,4%

As médias do tempo de sobrevida específica por melanoma em 5 anos para VEGF-C positivo foram de 100,21 meses (DP 8,0) e negativo 102,43 meses (DP 10,5). A mediana foi de 140 meses para ambos (DP 57) (Figura 13, Tabela 28).

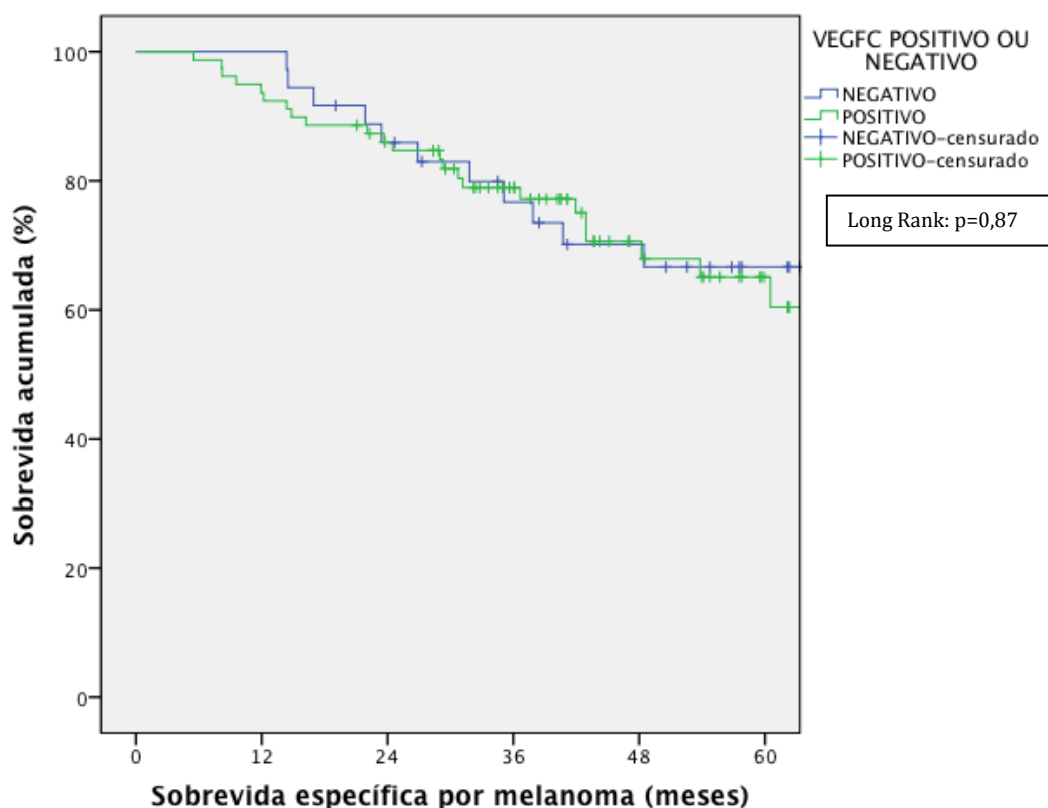


Figura 16 - Curva de tempo de sobrevida específica por melanoma de acordo com a imunoe expressão linfonodal (linfonodo sentinela) para VEGF-C em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Tabela 30 - Sobrevida específica por melanoma em 1, 3 e 5 anos para VEGF-C em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

VEGF-C	N	Eventos	1 ano	3 anos	5 anos
Negativo	36	12	100,0%	76,7%	66,7%
Positivo	79	24	93,7%	78,9%	65,1%

4.6.3 VEGF-A

As médias do tempo de sobrevida global para VEGF-A positivo e negativo foram respectivamente de 96,72 (DP 8,7) e 100,34 meses (DP 9,7). A mediana é de 140,03 para VEGF-A positivo e negativo (DP 61) (Figura 14, Tabela 29).

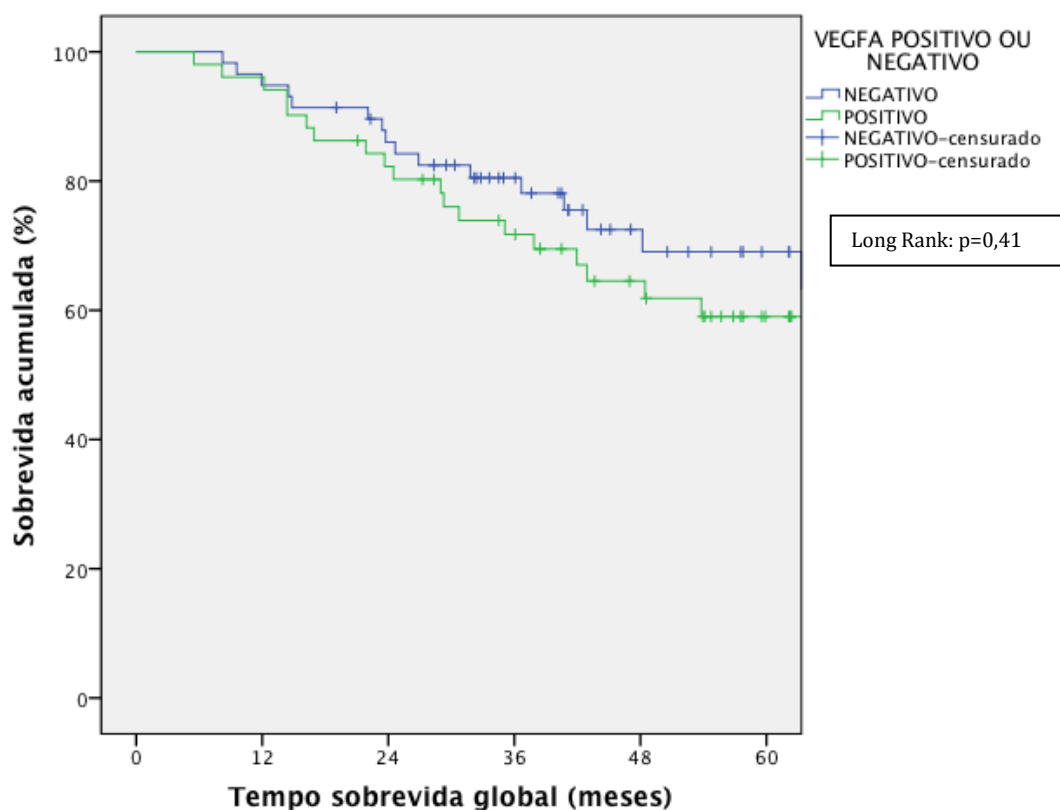


Figura 17 - Curva de sobrevida global de acordo com a imunoeexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para VEGF-A em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Tabela 31 - Sobrevida global em 1, 3 e 5 anos para VEGF-A em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

VEGF-A	N	Eventos	1 ano	3 anos	5 anos
Negativo	59	17	94,8%	80,5%	69,0%
Positivo	50	20	96,1%	71,7%	59,0%

As médias do tempo de sobrevida livre de doença para VEGF-A positivo foram de 79,58 meses (DP 9,9) e negativo 89,3 meses (DP 9,5). A mediana foi de 116 meses para VEGF-A positivo (DP 57) e 84 meses para VEGF-A negativo (DP 46) (Figura 15, Tabela 30).

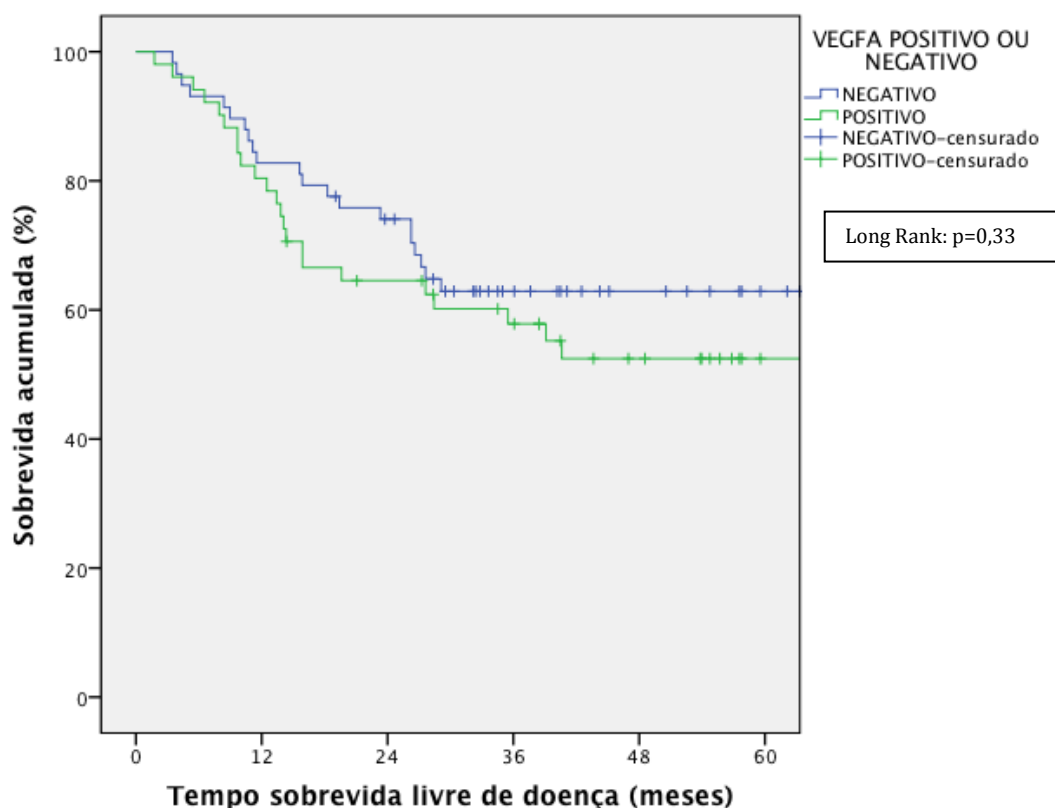


Figura 18 - Curva de sobrevida livre de doença de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para VEGF-A em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Tabela 32 - Sobrevida livre de doença em 1, 3 e 5 anos para VEGF-A em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

VEGF-A	N	Eventos	1 ano	3 anos	5 anos
Negativo	59	23	82,8%	62,9%	62,9%
Positivo	50	25	80,4%	57,8%	52,5%

As médias do tempo de sobrevida específica por melanoma para VEGF-A positivo foram de 96,04 meses (DP 8,7) e negativo 108,54 meses (DP 9,4). A mediana foi de 140,03 meses para ambos (DP 61) (Figura 16, Tabela 31).

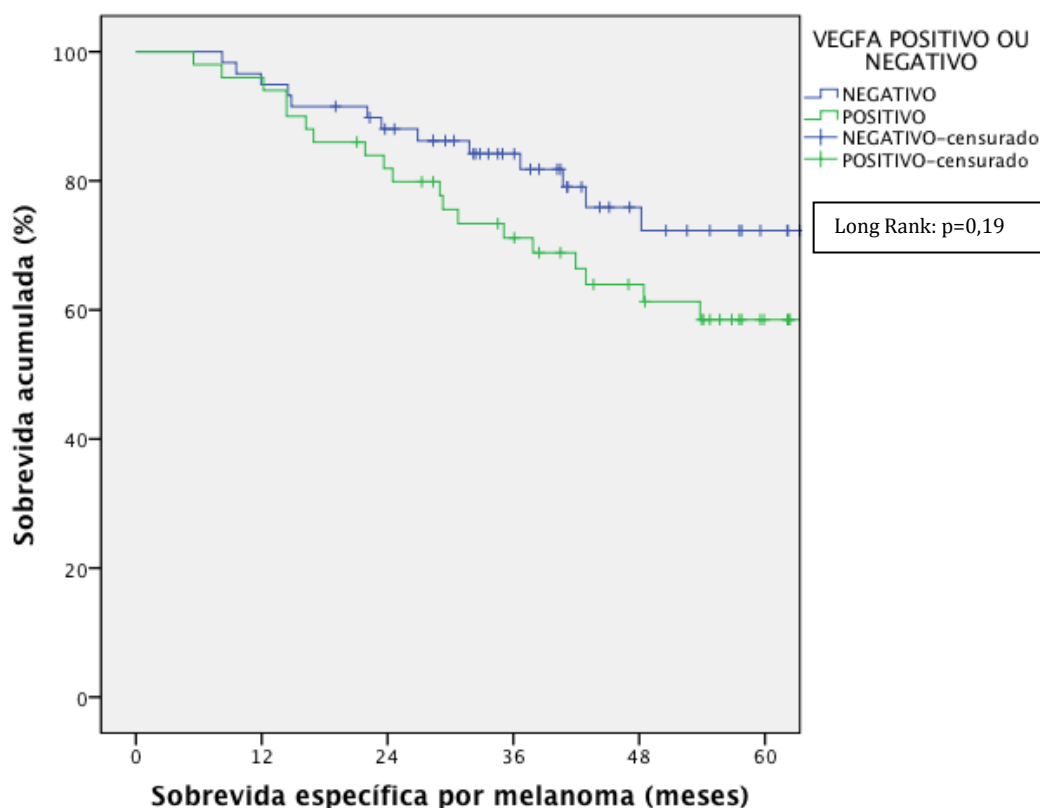


Figura 19 - Curva de tempo de sobrevida específica por melanoma de acordo com a imunoe expressão linfonodal (linfonodo sentinela) para VEGF-A em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Tabela 33 - Sobrevida específica por melanoma em 1, 3 e 5 anos para VEGF-A em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

VEGF-A	N	Eventos	1 ano	3 anos	5 anos
Negativo	59	14	94,9%	84,2%	72,3%
Positivo	50	20	96,0%	71,2%	58,5%

4.6.4 PDL-1

O PDL-1 foi estudado apenas no grupo de linfonodos sentinelas positivos. Os resultados das sobrevidas seguem abaixo.

As médias do tempo de sobrevida global para PDL1 positivo foram de 68,41 meses (DP 13) e negativo 39,08 meses (4,8). A mediana foi de 41 meses para PDL1 positivo (DP 10) e 36 meses para PDL1 negativo (DP 8,7) (Figura 17, Tabela 32).

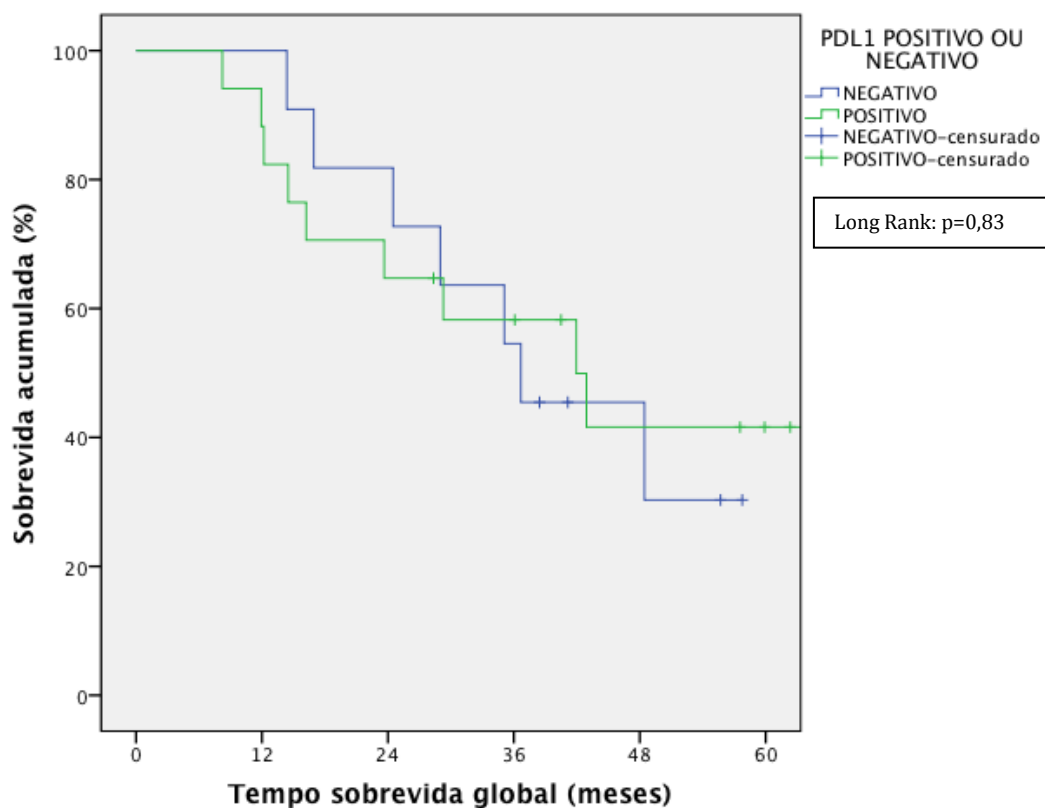


Figura 20 - Curva de tempo de sobrevida global de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para PDL1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Tabela 34 - Sobrevida global em 1, 3 e 5 anos para PDL1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

PDL1	N	Eventos	1 ano	3 anos	5 anos
Negativo	11	7	100%	54,5%	30,3%
Positivo	17	9	88,2%	58,2%	41,6%

As médias do tempo de sobrevida livre de doença para PDL1 positivo foram de 45,39 meses (DP 13,2) e negativo 32,17 meses (DP 5,8). A mediana foi de 13 meses para PDL1 positivo (DP 3,0) e 26 meses para PDL1 negativo (DP 5,2) (Figura 18, Tabela 33).

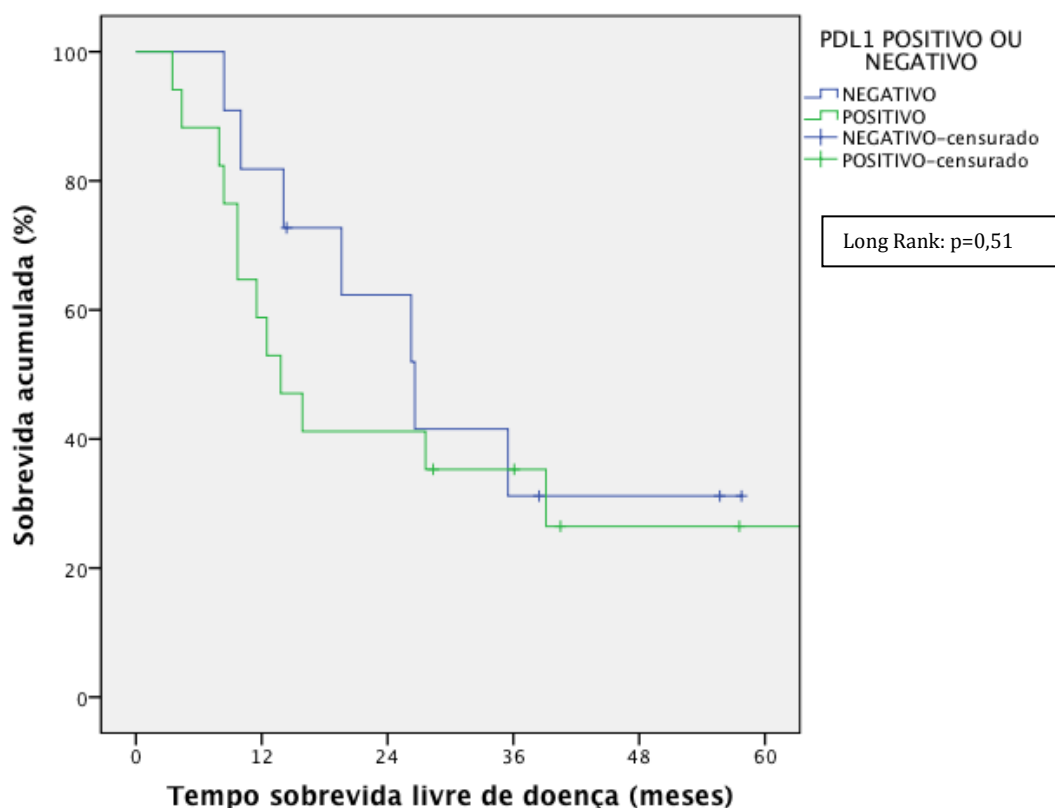


Figura 21 - Curva de tempo de sobrevida livre de doença de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para PDL1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Tabela 35 - Sobrevida livre de doença em 1, 3 e 5 anos para PDL1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

PDL1	N	Eventos	1 ano	3 anos	5 anos
Negativo	11	7	81,8%	31,2%	31,2%
Positivo	17	12	58,5%	35,3%	26,5%

As médias do tempo de sobrevida específica por melanoma para PDL1 positivo foram de 68,41 meses (DP 13,8) e negativo 39,08 meses (DP 4,8). A mediana foi de 41 meses para PDL1 positivo (DP 10) e 36 meses para PDL1 negativo (DP 8,7) (Figura 19, Tabela 34).

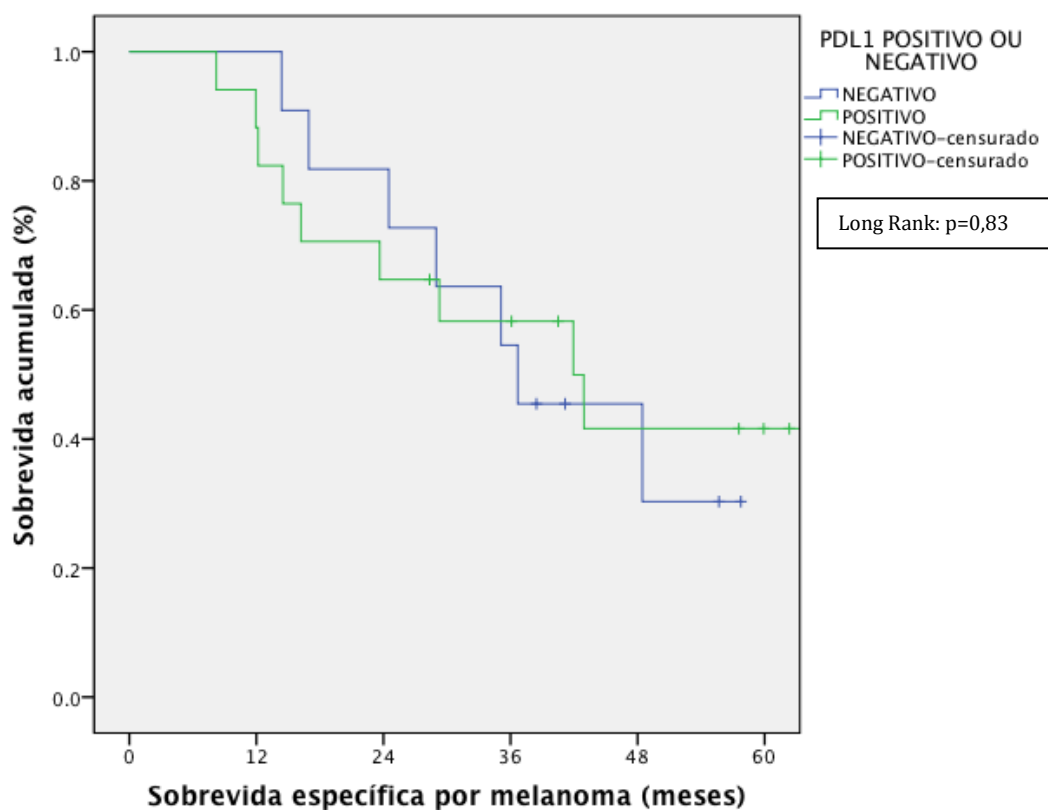


Figura 22 - Curva de tempo de sobrevida específica por melanoma de acordo com a imunoexpressão linfonodal (linfonodo sentinela) para PDL1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

Tabela 36 - Sobrevida específica por melanoma em 1, 3 e 5 anos para PDL1 em portadores de melanoma cutâneo do Hospital de Câncer de Barretos.

PDL1	N	Eventos	1 ano	3 anos	5 anos
Negativo	11	7	100%	54,5%	30,3%
Positivo	17	9	88,2%	58,2%	41,6%

5 DISCUSSÃO

O melanoma sempre se apresentou de maneira desafiadora, com um grande espectro de apresentações clínicas. Desde tumores iniciais de baixa espessura, tumores metastáticos linfonodais algumas vezes indolentes até uma apresentação agressiva e metastática, por vezes fatal.

Na epidemiologia a literatura mostra frequência semelhante em homens e mulheres⁴, o que também foi encontrado em nosso estudo, em que pouco mais de 50% das pacientes eram mulheres. Quanto à cor da pele, geralmente os melanomas são descritos tipicamente em pacientes de pele branca^{5, 11}, dado que vai de encontro com nossa casuística, em que mais de 80% dos pacientes eram brancos. Na população estudada, o melanoma acometeu a faixa de idade entre 41 a 60 anos, com 57 (49,1%) casos, ou seja, população adulto jovem, também de acordo com a literatura¹².

Sabe-se da relação do melanoma com exposição solar e o Brasil é um país tropical, com altos índices de radiação ultra-violeta¹⁶. Em relação à exposição solar, 68 pacientes (66%) relataram exposição ao sol atual, indicando sua maior ocorrência em pessoas com antecedente de radiação UV.

O tipo histológico mais frequente na população caucasiana, segundo dados da literatura, é o subtipo extensivo superficial, seguido do subtipo nodular¹². Em nosso estudo, houve frequência de 40 (39,2%) dos casos do subtipo nodular e 38 (37,3%) do subtipo extensivo superficial. Também chama atenção a presença de 18 (17,6%) do subtipo acrolentiginoso, que na maioria das casuísticas é de apenas 5% da população caucasiana, incluindo dados históricos do Hospital de Câncer de Barretos com frequência observada de cerca de 7%²⁸.

Diferente do descrito nos Estados Unidos, em que 70% dos melanomas são diagnosticados com espessura de Breslow menor que 1 mm⁹, nossa amostra apresentava mais de 80% dos casos com Breslow acima de 1,0 mm com uma espessura média alta. Por esse motivo também tivemos casos com estágio patológico acima de II em mais de 80% dos pacientes. Isso também está de acordo com dados brasileiros do Hospital de Câncer de Barretos, mostrando assim como dados de outros centros, uma espessura de Breslow mais alta que o encontrado em países europeus e norteamericanos^{9, 28}.

As referências quanto à realização de biópsia de melanoma recomendam a biópsia excisional para diagnóstico das lesões¹⁹, o que foi de encontro aos nossos pacientes, que realizaram esse procedimento em 70% dos casos.

A técnica da pesquisa de linfonodo sentinela utilizada no HCB é o padrão-ouro para a realização desse procedimento²⁰. Apresentamos uma taxa de falso-negativo de 7,5%, sendo que na literatura essas taxas variam de 4% a 12,5%.

A partir da descoberta de marcadores moleculares relacionados ao câncer, os estudiosos em melanoma começaram a buscar aqueles relacionados a este tumor. Mas pouco se sabe a respeito de marcadores nos linfonodos metastáticos e não metastáticos de melanoma como preditores de metástases.

O primeiro dado interessante a respeito da expressão de PD-1 foi sua presença em células T nos centros germinativos dos linfonodos sentinelas sem metástases. Nosso estudo foi capaz de encontrar uma associação pertinente entre a positividade de PD1 e a idade acima de 60 anos, estágio T III e IV e para os linfonodos positivos. Também encontrou diferença na sobrevida global em 5 anos. Alguns estudos do assunto, como Kakavand et al em 2015 demonstraram presença de PD-1 positivo peritumoral e intra-tumoral em linfonodos sentinelas positivos, sem comprovar relação entre a positividade e a sobrevida global e a sobrevida livre de doença, apesar de não terem avaliado essa positividade em relação aos outros contextos de linfonodo sentinela⁵¹.

A presença de PD1 nos linfonodos indica ativação do sistema imune, que em alguns casos não evoluiu com a metástase (LN0 e LN1-) e em outros casos não foi capaz de inibir a metástase (LN1+), ou pode ser inespecífica e presente em linfonodos em geral. Nossa amostra contou com índice alto de tumores expressando PDL-1 na membrana nos linfonodos LN1+, o que sugere, como no estudo de Tarhini⁴⁴, que a presença do receptor e seu ligante são realmente capazes de inibir o sistema imune e favorecer o crescimento tumoral.

Tarhini et al em seu estudo publicado em 2015, em que avaliou 24 linfonodos sentinelas positivos, encontrou 62% deles positivos para PDL-1 (acima de 1% de marcação em membranas de células tumorais) e também avaliou áreas sem tumor do linfonodo (tecido linfóide). Foi avaliado PDL-1 em histiócitos sinusoidais e em células dendríticas e macrófagos desses linfonodos e encontrados resultados de marcação intensa (acima de 2 em uma classificação de 0 a 5) em mais de 50% dos casos⁴⁴. Nosso estudo encontrou 60,7%

de positividade de PDL-1 na membrana de células tumorais no grupo LN1+ e 10,3% desse marcador em macrófagos, porém não o estudou nos grupos LN0 e LN1-, abrindo espaço para estudo desse marcador em linfonodos não-metástáticos. Sabendo das características do microambiente tumoral, que utiliza-se de citocinas para estimular a presença de macrófagos associados ao tumor³⁷, a presença desses macrófagos parece fazer parte do sistema de cooperação imune pró-tumoral.

Os achados de PD1 nos grupos LN0 e LN1- em células centrofoliculares comprovam a existência desse receptor nas células T normais. A presença aumentada desse marcador em linfonodos negativos poderia estar relacionada a aumento do sistema de defesa nesses linfonodos, porém novos estudos precisam dessa comprovação. O grupo LN1+ também apresentou elevadas porcentagens de PD1 positivo, refletindo uma tendência do linfonodo em apresentar suas células de defesa frente à invasão tumoral. Sabendo desse dado, e que esse grupo de linfonodos apresentou PDL1 aumentado, nota-se a capacidade do tumor em inibir as células T através da ligação com o PD1.

Com a descoberta de drogas anti-PD1 que foram capazes de prolongar a sobrevida dos pacientes com melanomas, de forma ainda mais expressiva nos portadores de tumores com expressão de PDL-1^{32, 52}, a confirmação de que as metástases linfonodais também apresentam PDL-1 positivo ganha importância. A presença desse marcador na metástase corrobora o uso dessas drogas, que são capazes de bloquear a ativação do PD-1 com seu ligante, impedindo que o sistema imune fique prejudicado.

A confirmação de que o microambiente tumoral é capaz de inibir a resposta imune tumoral³⁶ e que isso se repete no microambiente dos linfonodos corrobora com as pesquisas clínicas e utilização de drogas anti-PD1. Sabendo da importância do sistema imune contra os tumores, permitir que as células T permaneçam capazes de atuar parece ser promissor no tratamento dessas neoplasias³⁶.

Um artigo em que a expressão do PDL-1 em células tumorais de melanomas primários e linfonodos metastáticos, não submetidos a imunoterapia, analisados por imuno-histoquímica através de lâminas recuperadas de blocos de parafina, em relação à sobrevida global, não houve diferença significativa em grupos PDL-1 positivos ou negativos⁴³, o que também ocorreu na análise de sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida específica por melanoma deste estudo. Esperava-se que tumores PDL-1 positivo tivessem

capacidade aumentada de metástase e diminuição da sobrevida, entretanto não houve comprovação científica até o momento.

Em 2005, Soheil, buscando encontrar marcadores tumorais relacionados à metástase linfonodal, em um estudo de 45 melanomas primários, todos submetidos à PLS, sendo 18 positivos e 27 negativos, obteve 88,2% de células tumorais marcadas por VEGF-C nos casos positivos contra 44% nos tumores com linfonodo sentinela negativo, evidenciando o marcador como preditor de metástases linfonodais⁵⁹. Em 2015, outro estudo comprovou uma maior positividade em melanomas (tumores primários) com linfonodos metastáticos, sugerindo seu uso como preditor de metástase⁵⁵. No nosso estudo, os três grupos apresentaram marcação positiva para VEGF-C, porém foi mais fortemente positivo no grupo LN1 de maneira significativa, corroborando os dados anteriores.

Peppicelli em 2008 notou a presença e a capacidade dos macrófagos associados ao tumor de produzirem e estimularem a produção de VEGF-C, tendo sua importância na disseminação linfática³⁵. Houve marcação de VEGF-C em macrófagos nos três grupos desta pesquisa, em especial nos grupos LN0 e LN1- e nesses casos, não houve associação com o surgimento de metástases.

A presença de VEGF-A em melanomas foi descrito por diversos autores^{54, 60}, assim como sua associação com linfangiogênese para linfonodos sentinelas, já que a presença de VEGF-A induz a ativação e proliferação do receptor VEGFR-2 em vasos linfáticos associados à neoplasia propiciando a metástase a este linfonodo⁶¹. Nossos achados foram fortemente positivos para VEGF-A nos linfonodos metastáticos. Apesar do VEGF-A ser mais relacionado à angiogênese, o fato dele estimular os receptores VEGFR-2 facilitaria a ação do VEGF-C, relacionado à linfangiogênese..

As curvas de sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida específica por melanoma para VEGF-A não apresentaram diferença estatisticamente significativa, porém se nota um distanciamento das curvas, e essa diferença pode eventualmente ser significativa em um universo amostral mais amplo, já que o número de pacientes incluído neste estudo foi baixo.

Interessante notar que uma de nossas hipóteses era que a região linfonodal que foi afetada por uma metástase, poderia já apresentar nos outros linfonodos não atingidos pelo melanoma, características (marcadores) semelhantes ao do linfonodo tumoral, e isso não se confirmou. Existem várias maneiras de tentar teorizar sobre isso. Uma é que o

microambiente afetado seria mais limitado do que imaginávamos, ou seja, nos bordos limitantes do tumor, pelo menos nos casos com pouca carga tumoral. Outra possibilidade é que estes marcadores não são alterados neste nível, mas talvez outros seriam.

De qualquer maneira, tanto o PD1 como VEGF-A e VEGF-C foram mais expressos em pacientes com estádios clínicos mais avançados (Tabela 19), e nas metástases, mostrando um envolvimento ao menos indireto, destes marcadores na progressão tumoral.

Esse estudo foi pioneiro na descrição dos marcadores em linfonodos não metastáticos de melanoma e sua associação com linfonodos metastáticos. Nossos achados foram compatíveis com as descrições de que a presença da neoplasia (no caso melanoma), está associada a expressão de PDL1 e maior expressão de VEGF C e VEGF A. Interessante, isso não foi associado a diferentes taxas de sobrevida, o que, conforme já comentado anteriormente, poderia eventualmente ser evidenciado em uma coorte com número expressivo de casos.

6 CONCLUSÕES

- 1- Determinamos a expressão de PD1, VEGF C e VEGF A, em um cenário linfonodal regional, tanto para linfonodos não metastáticos em pacientes sem metástases linfonodais como para linfonodos metastáticos e não metastáticos em pacientes portadores de metástases linfonodais;
- 2- A expressão de PD1, VEGF A e VEGF C nos linfonodos foi associada à presença da metástase linfonodal e foi muito mais presente no tumor que no tecido linfonodal per si;
- 3- A expressão dos marcadores PD1, VEGF A e VEGF C nos linfonodos negativos da região com presença de metástase linfonodal não se assemelhou à expressão destes marcadores no linfonodo metastático;
- 4- Não houve associação da expressão dos marcadores estudados a diferentes taxas de sobrevivência, como também não houve associação a nenhuma característica demográfica, clínica ou histopatológica, exceto ao estágio clínico, associado a maior expressão de todos os marcadores na presença de estádios mais avançados.

7 REFERÊNCIAS

1. Bradford PT, Goldstein AM, McMaster ML, Tucker MA. Acral lentiginous melanoma: incidence and survival patterns in the United States, 1986-2005. *Archives of dermatology*. 2009;145(4):427-34.
2. National comprehensive cancer network. 2015.
3. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy dermatologii i alergologii*. 2013;30(1):30-41.
4. Instituto Nacional do Câncer: Estimativas 2016 - incidência de câncer no Brasil. 2016.
5. Naser N. Cutaneous melanoma - a 30-year-long epidemiological study conducted in a city in Southern Brazil, from 1980-2009. *An Bras Dermatol*. 2011;85(5):932-41.
6. cancer IAFro. Globocan 2012: estimate cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. 2012.
7. Departamento de informática do SUS. 2015.
8. Kabigting FD, Nelson FP, Kauffman CL, Popoveniuc G, Dasanu CA, Alexandrescu DT. Malignant melanoma in African-Americans. *Dermatology online journal*. 2009;15(2):3.
9. Wong SL, Balch CM, Hurley P, Agarwala SS, Akhurst TJ, Cochran A, et al. Sentinel lymph node biopsy for melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology joint clinical practice guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(23):2912-8.
10. Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer research*. 1969;29(3):705-27.
11. Organization WH. 2015.
12. Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Molecular oncology*. 2011;5(2):124-36.
13. Saldanha G, Potter L, Daforio P, Pringle JH. Cutaneous melanoma subtypes show different BRAF and NRAS mutation frequencies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(15):4499-505.
14. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of surgery*. 1970;172(5):902-8.
15. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(36):6199-206.
16. Bermudez Y. Ultraviolet involvement in melanocyte transformation to melanoma. *The British journal of dermatology*. 2014;171(6):1289.
17. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *The New England journal of medicine*. 2005;353(20):2135-47.
18. Premi S, Wallisch S, Mano CM, Weiner AB, Bacchiocchi A, Wakamatsu K, et al. Photochemistry. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. *Science*. 2015;347(6224):842-7.
19. Sladden MJ, Balch C, Barzilai DA, Berg D, Freiman A, Handiside T, et al. Surgical excision margins for primary cutaneous melanoma. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2009(4):CD004835.

20. Bagaria SP, Faries MB, Morton DL. Sentinel node biopsy in melanoma: technical considerations of the procedure as performed at the John Wayne Cancer Institute. *Journal of surgical oncology*. 2010;101(8):669-76.
21. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Nieweg OE, Roses DF, et al. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. *The New England journal of medicine*. 2014;370(7):599-609.
22. McGregor JM, Sasieni P. Sentinel node biopsy in cutaneous melanoma: time for consensus to better inform patient choice. *The British journal of dermatology*. 2015;172(3):552-4.
23. Morton DL, Cochran AJ, Thompson JF, Elashoff R, Essner R, Glass EC, et al. Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. *Annals of surgery*. 2005;242(3):302-11; discussion 11-3.
24. Veronesi U, Adamus J, Bandiera DC, Brennhovd IO, Caceres E, Cascinelli N, et al. Inefficacy of immediate node dissection in stage 1 melanoma of the limbs. *The New England journal of medicine*. 1977;297(12):627-30.
25. Cochran AJ, Wen DR, Morton DL. Occult tumor cells in the lymph nodes of patients with pathological stage I malignant melanoma. An immunohistological study. *The American journal of surgical pathology*. 1988;12(8):612-8.
26. Filho RSO, Santos IADO, Ferreira LM, Almeida FA, Barbieri A, Enokihara MMSS. Linfadenectomia seletiva com biópsia de linfonodo sentinela no melanoma cutâneo. Experiência brasileira - Projeto FAPESP 97/2516-0. *An Bras Dermatol*. 2000;75(5):573-80.
27. Manca G, Rubello D, Romanini A, Mariani G. False-negative sentinel lymph node biopsy in melanoma patients. *Nuclear medicine communications*. 2014;35(10):989-94.
28. Vazquez Vde L, Silva TB, Vieira Mde A, de Oliveira AT, Lisboa MV, de Andrade DA, et al. Melanoma characteristics in Brazil: demographics, treatment, and survival analysis. *BMC research notes*. 2015;8:4.
29. Kretschmer L, Bertsch HP, Zapf A, Mitteldorf C, Satzger I, Thoms KM, et al. Nodal Basin Recurrence After Sentinel Lymph Node Biopsy for Melanoma: A Retrospective Multicenter Study in 2653 Patients. *Medicine*. 2015;94(36):e1433.
30. Valsecchi ME, Silbermins D, de Rosa N, Wong SL, Lyman GH. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in patients with melanoma: a meta-analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(11):1479-87.
31. Boland GM, Gershenwald JE. Principles of Melanoma Staging. *Cancer treatment and research*. 2016;167:131-48.
32. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2015;373(1):23-34.
33. Wolchok J. How recent advances in immunotherapy are changing the standard of care for patients with metastatic melanoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23 Suppl 8:viii15-21.
34. Mimeault M, Batra SK. Novel biomarkers and therapeutic targets for optimizing the therapeutic management of melanomas. *World journal of clinical oncology*. 2012;3(3):32-42.
35. Liu B, Ma J, Wang X, Su F, Li X, Yang S, et al. Lymphangiogenesis and its relationship with lymphatic metastasis and prognosis in malignant melanoma. *Anatomical record*. 2008;291(10):1227-35.
36. Harris TJ, Drake CG. Primer on tumor immunology and cancer immunotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2013;1:12.

37. Icard P, Kafara P, Steyaert JM, Schwartz L, Lincet H. The metabolic cooperation between cells in solid cancer tumors. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1846(1):216-25.
38. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4):298-306.
39. Blankenstein T, Coulie PG, Gilboa E, Jaffee EM. The determinants of tumour immunogenicity. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4):307-13.
40. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins&Cotran Patologia: bases patológicas das doenças*. 2010;8.
41. Riley JL. Combination checkpoint blockade--taking melanoma immunotherapy to the next level. *The New England journal of medicine*. 2013;369(2):187-9.
42. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*. 2010;116(7):1757-66.
43. Gadiot J, Hooijkaas AI, Kaiser AD, van Tinteren H, van Boven H, Blank C. Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma. *Cancer*. 2011;117(10):2192-201.
44. Tarhini AA, Zahoor H, Yearley JH, Gibson C, Rahman Z, Dubner R, et al. Tumor associated PD-L1 expression pattern in microscopically tumor positive sentinel lymph nodes in patients with melanoma. *Journal of translational medicine*. 2015;13:319.
45. Bello DM, Ariyan CE, Carvajal RD. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*. 2013;20(4):261-81.
46. Postow MA, Harding J, Wolchok JD. Targeting immune checkpoints: releasing the restraints on anti-tumor immunity for patients with melanoma. *Cancer journal*. 2012;18(2):153-9.
47. Yang X, Zhang Y, Hosaka K, Andersson P, Wang J, Tholander F, et al. VEGF-B promotes cancer metastasis through a VEGF-A-independent mechanism and serves as a marker of poor prognosis for cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(22):E2900-9.
48. Kenchappa RS, Tran N, Rao NG, Smalley KS, Gibney GT, Sondak VK, et al. Novel treatments for melanoma brain metastases. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*. 2013;20(4):298-306.
49. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *The New England journal of medicine*. 2013;369(2):122-33.
50. Madore J, Vilain RE, Menzies AM, Kakavand H, Wilmott JS, Hyman J, et al. PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials. *Pigment cell & melanoma research*. 2015;28(3):245-53.
51. Kakavand H, Vilain RE, Wilmott JS, Burke H, Yearley JH, Thompson JF, et al. Tumor PD-L1 expression, immune cell correlates and PD-1+ lymphocytes in sentinel lymph node melanoma metastases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2015;28(12):1535-44.
52. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2015;372(26):2521-32.

53. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *The New England journal of medicine*. 2015;372(4):320-30.
54. Buzrla P, Dvorackova J, Motyka O. Lymphangiogenesis and its correlation with the VEGF expression and the sentinel lymph node in cutaneous melanomas. *BioMed research international*. 2014;2014:372979.
55. Spiric Z, Eri Z, Eric M. Significance of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-C and VEGF-D in the Progression of Cutaneous Melanoma. *International journal of surgical pathology*. 2015;23(8):629-37.
56. Flaherty KT. New molecular targets in melanoma. *Current opinion in oncology*. 2004;16(2):150-4.
57. Peppicelli S, Bianchini F, Contena C, Tombaccini D, Calorini L. Acidic pH via NF-kappaB favours VEGF-C expression in human melanoma cells. *Clinical & experimental metastasis*. 2013;30(8):957-67.
58. Liersch R, Hirakawa S, Berdel WE, Mesters RM, Detmar M. Induced lymphatic sinus hyperplasia in sentinel lymph nodes by VEGF-C as the earliest premetastatic indicator. *International journal of oncology*. 2012;41(6):2073-8.
59. Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Nguyen L, Vora A, Muzikansky A, et al. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005;18(9):1232-42.
60. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(7):1089-99.
61. Tobler NE, Detmar M. Tumor and lymph node lymphangiogenesis--impact on cancer metastasis. *Journal of leukocyte biology*. 2006;80(4):691-6.

Anexo A -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Marcadores moleculares relacionados ao microambiente linfonodal nos melanomas com e sem metástase

Pesquisador: Cristina Alessi da Rocha

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 24175613.1.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 540.165

Data da Relatoria: 21/02/2014

Apresentação do Projeto:

A presente submissão trata-se de uma EMENDA ao Estudo Supracitado, onde o Pesquisador Principal está incluindo dois membros em sua Equipe de Pesquisa (Adhemar Longatto e Cristiano Viana, que ficarão responsáveis diretos pela análise imuno-histoquímica.

Objetivo da Pesquisa:

Incluir dois membros na Equipe de Pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem comentários e considerações adicionais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários e considerações adicionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos referentes a EMENDA submetida foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências e/ou inadequações.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-6600 **Fax:** (17)3321-6629 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 540.165

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos analisou o(s) seguinte(s) documento(s) do projeto 760/2013, e:

- APROVOU a EMENDA ao Estudo Supracitado, submetido em 17/02/2014;

Após análise do(s) documento(s) supracitado(s), o Comitê faz a seguinte recomendação:

- (x) O Estudo deve Continuar;
- () O Estudo deve ser Interrompido;
- () Solicita-se Esclarecimentos;
- () O Estudo está Finalizado;

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios parciais (semestrais) sendo o próximo previsto para 09/07/2014 .
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.
3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-6600 **Fax:** (17)3321-6629 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 540.165

BARRETOS, 25 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
Ednise Woyciechowski
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-6600 **Fax:** (17)3321-6629 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br