

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE MEDICINA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**IMUNOHISTOQUÍMICA E ESTADIAMENTO DO  
MELANOMA FINO**

**Doutoranda: Ana Gabriela Sálvio**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariângela Esther Alencar Marques**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP para obtenção de título de Doutor em Patologia.

**BOTUCATU - SP**

**2006**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Salvio, Ana Gabriela.

Imunohistoquímica e estadiamento do melanoma fino / Ana Gabriela  
Salvio. – Botucatu : [s.n.], 2005.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista, 2005.

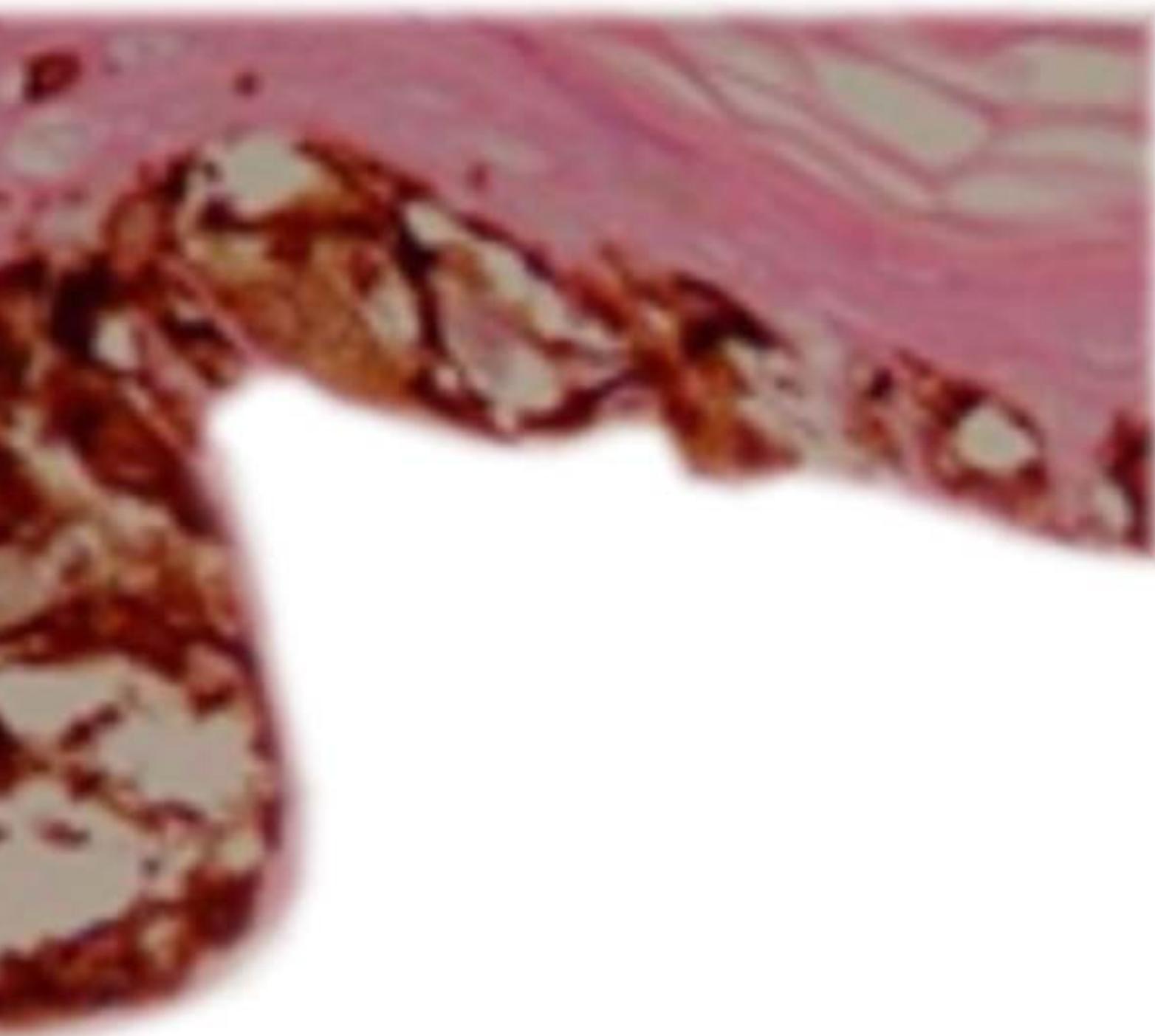
Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.Mariângela Esther Alencar Marques.

Assunto CAPES: 40101045

1. Melanoma – Patologia.

CDD 616.994

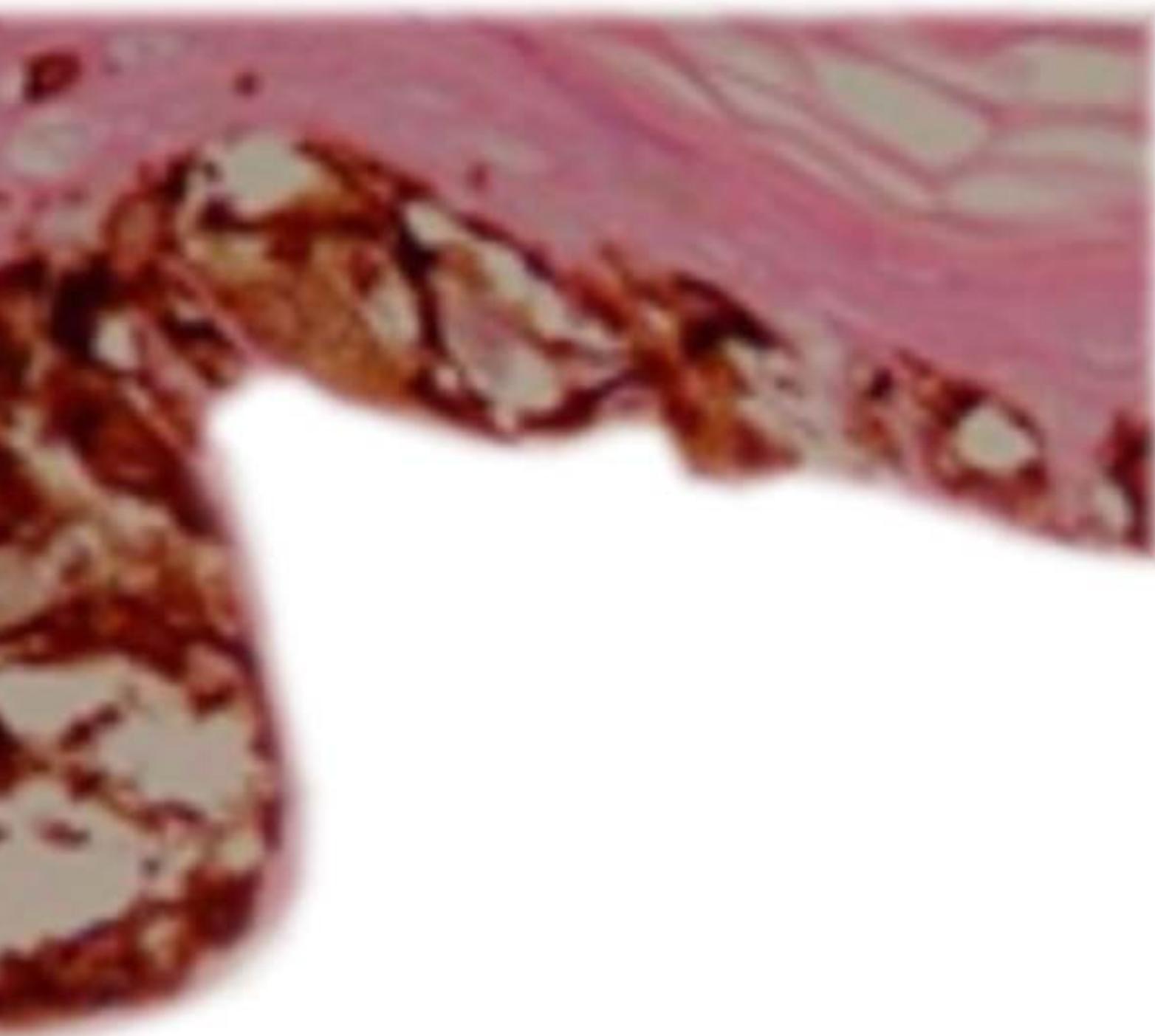
Palavras-chave: Imunistoquímica; Infiltrado linfocitário ativo; Melanoma.



## *Dedicatória*

---

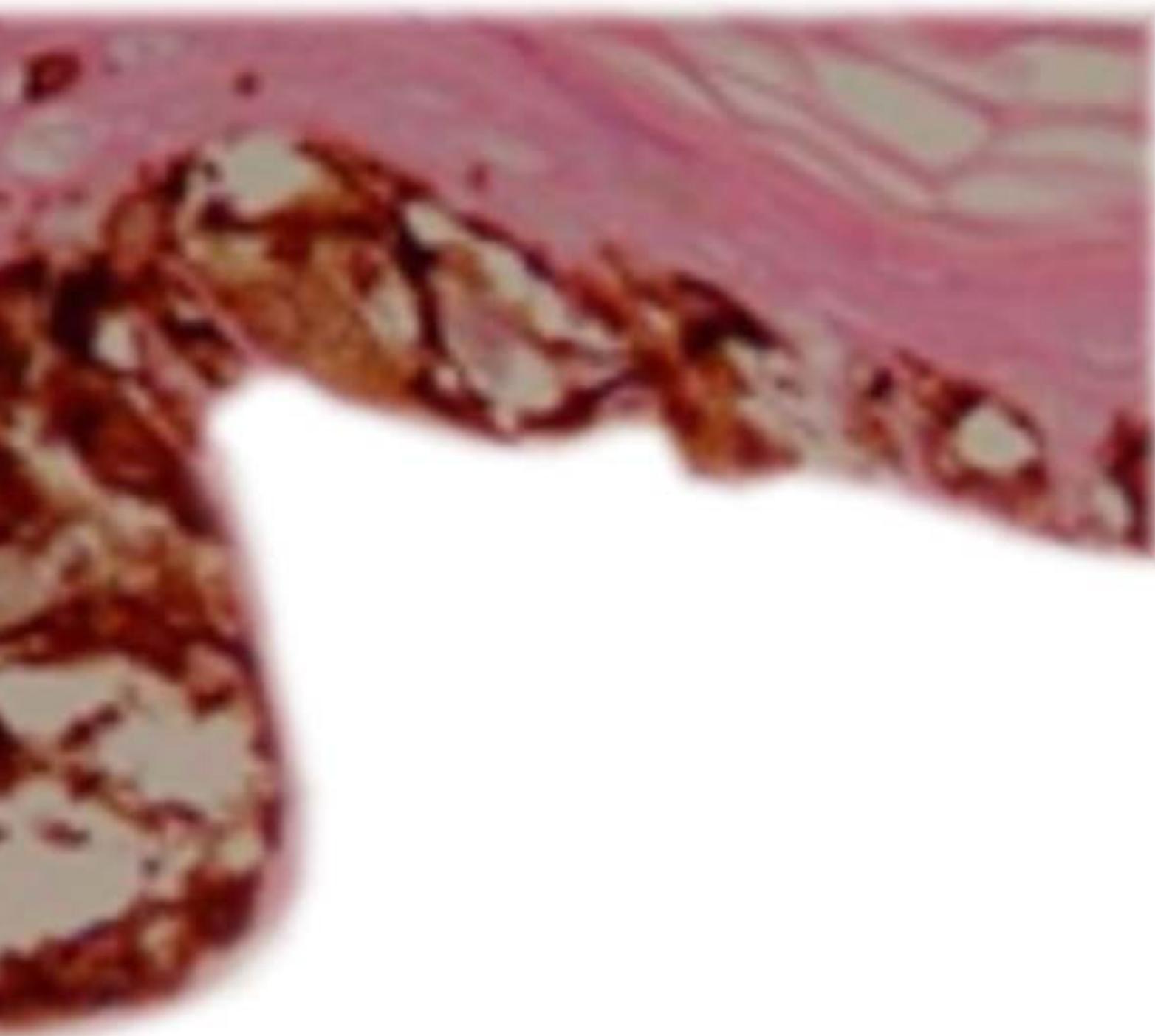
*Ao meu marido, Eduardo,  
meus pais, Cláudinei e Suzana, e  
às minhas irmãs, Luciana e Carolina,  
Pelo ensinamento, incentivo, compreensão e amor  
durante as diferentes etapas percorridas.*



*Agradecimento Especial*

*À Profa. Dra. Mariângela Esther Alencar Marques, minha orientadora e "musa inspiradora" pelos exemplos profissional e pessoal, pelos ensinamentos e pela dedicação que me dispensou. A você, que incondicionalmente aceitou e fez este momento tornar-se realidade, meus sinceros e eternos agradecimentos.*

---



## *Agradecimentos*

---

Aos colegas e amigos Dr Francisco C. Quevedo, Dr Francisco de Moraes Neto e Dr Adauto J. Nunes do Serviço de Patologia do Hospital Amaral Carvalho, pelo incentivo e colaboração no projeto.

Aos amigos e colegas Dr. Ary Assumpção Júnior, Dr. Romeu Frisina Filho e Dr José Getúlio M Segalla pelo apoio desde o início da pós graduação.

Aos professores do Departamento de Patologia pela atenção que me dispensaram nestes anos

Ao prof Dr. José Eduardo Corrente, responsável pela análise estatística dos trabalhos

À coordenadora do curso de pós graduação Dra Denise Fecchio, que prontamente encontrava-se à disposição para eventuais dúvidas sobre o curso de pós graduação

A funcionário José Carlos Pedroso Lima o qual desempenhou papel fundamental na confecção do material

---

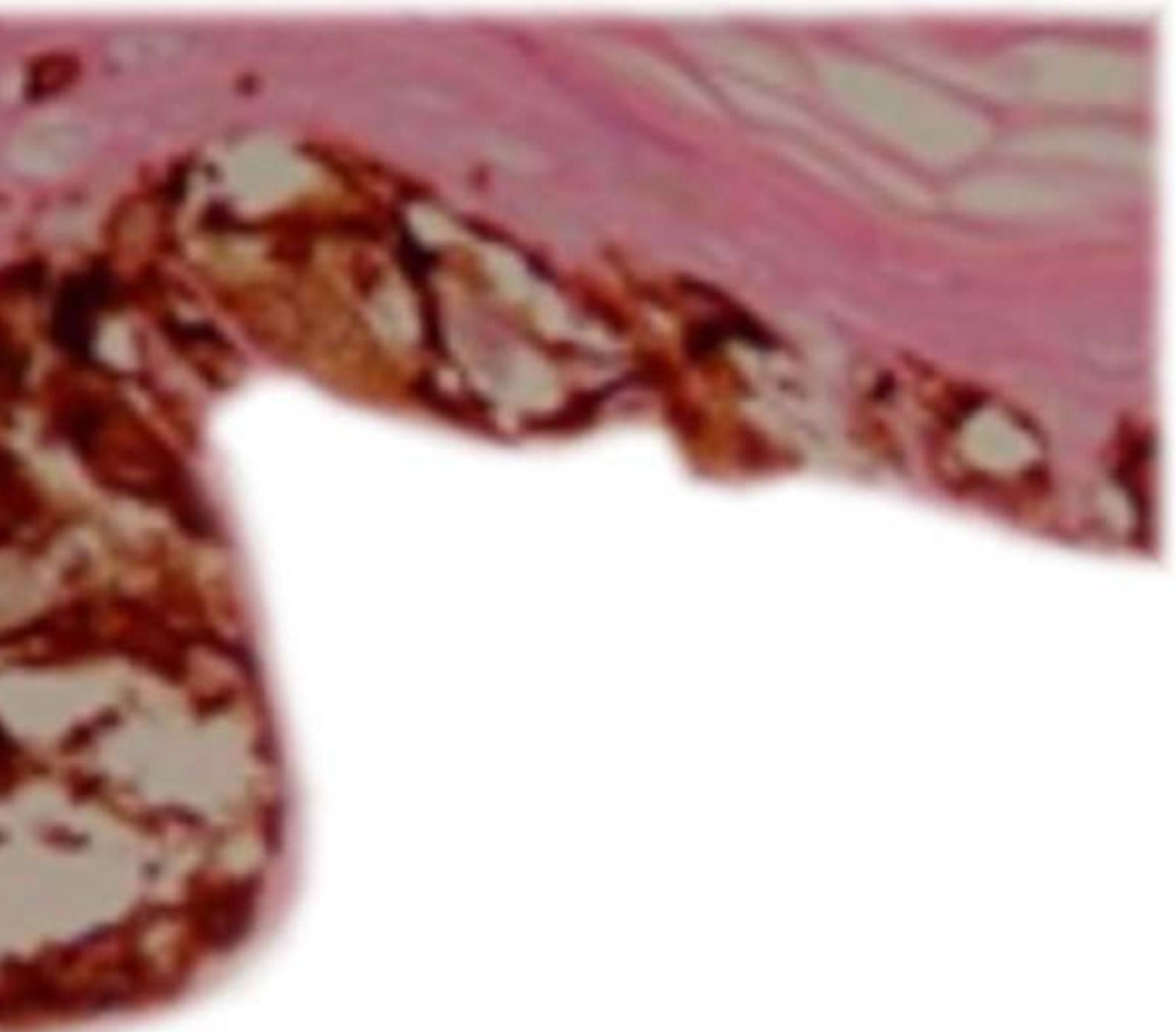
*Às funcionárias Célene Maria Carvalho Gandin e Marcos Roberto Franchi responsáveis pela imunohistoquímica, parte fundamental do estudo*

*Às funcionárias do Departamento de Patologia, Maruá Lúcia da Silva, Cícera Aparecida da Silva Brito e Denise Aparecida dos Santos Capô, e o secretário Luciano Nadai Donini pela amizade e constante auxílio durante o transcorrer do estudo*

*Às secretárias Helen Renata Nicolini, Reniele Didone e Maristela Roda que sempre me ajudaram*

*A todos os funcionários do Serviço de Patologia do hospital Amaral Carvalho*

*E a todos, que de uma forma ou de outra, participaram durante esta etapa de minha vida e me ajudaram a concretizá-la.*



---

## *Sumário*

**Capítulo I**

<b>Introdução e Revisão da Literatura</b>	13
---	----

Referências Bibliográficas .....	25
----------------------------------	----

**Capítulo II**

<b>Imunohistoquímica para identificação de células neoplásicas no infiltrado ativo de melanomas finos</b>	34
---	----

Resumo .....	35
--------------	----

Abstract .....	36
----------------	----

Introdução .....	37
------------------	----

Objetivo .....	38
----------------	----

Materiais e Métodos .....	39
---------------------------	----

Resultados .....	41
------------------	----

Discussão .....	47
-----------------	----

Conclusão .....	48
-----------------	----

Referências .....	50
-------------------	----

**Capítulo III**

<b>Identification of neoplastic cells in the lymphocytic infiltrate associated to “in situ” melanomas</b>	53
---	----

Abstract .....	54
----------------	----

Introduction .....	55
--------------------	----

Materials and Methods .....	56
-----------------------------	----

Results .....	59
---------------	----

Discussion .....	66
------------------	----

References .....	70
------------------	----

**Capítulo IV**

<b>Expression of Melan-A positive cells in lymphocytic tumor infiltrate associated to microinvasive melanomas: role of the Breslow thickness</b>	76
--	----

Abstract .....	77
----------------	----

Introduction .....	78
--------------------	----

Materials and Methods .....	79
-----------------------------	----

Results .....	82
---------------	----

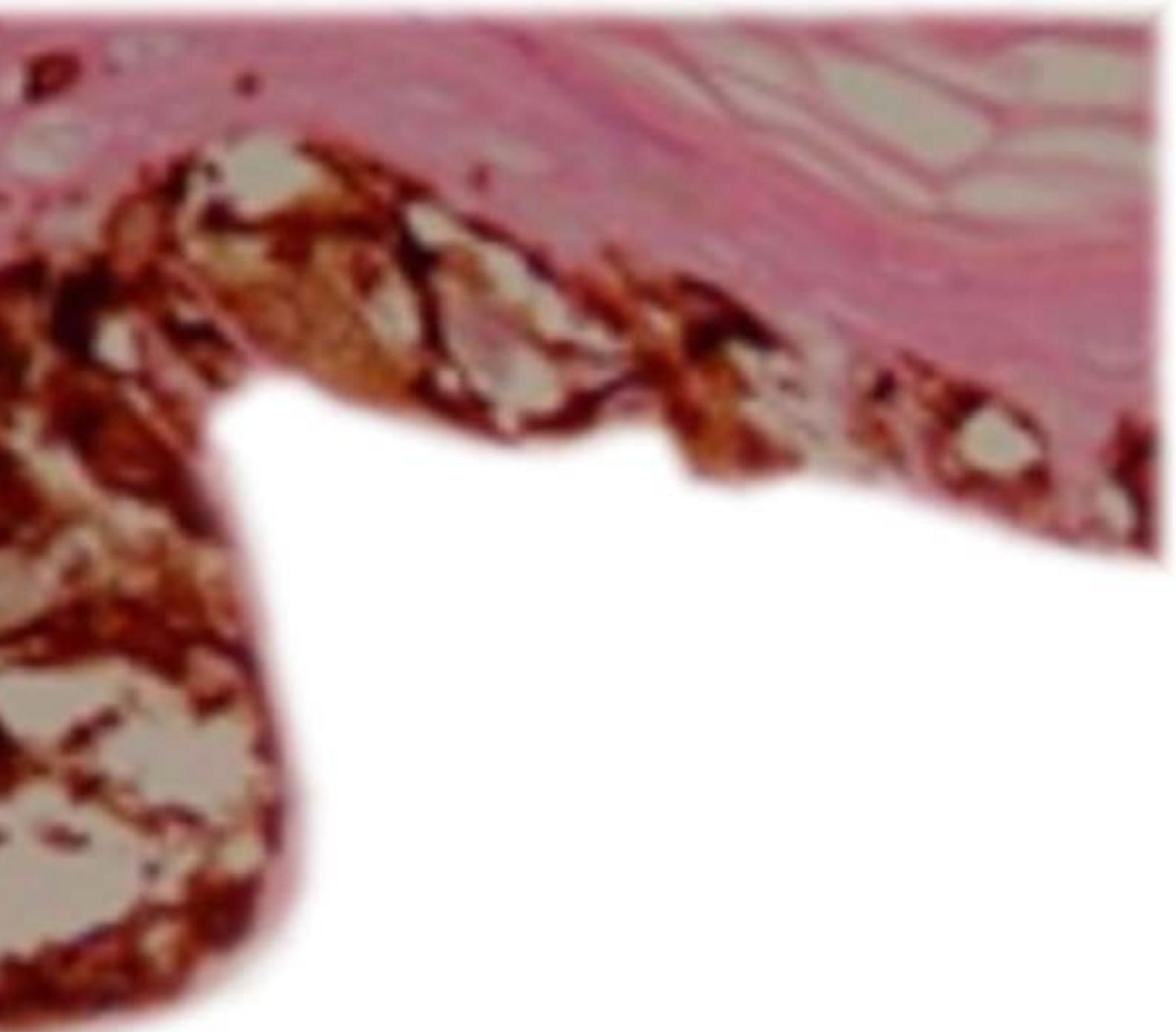
Discussion .....	87
------------------	----

References .....	91
------------------	----

---

<b>Capítulo V</b>	
<b>Discussão</b>	96
Referências Bibliográficas.....	105
<b>Capítulo VI</b>	
<b>Conclusão</b>	113
<b>Capítulo VII</b>	
<b>Apêndice</b>	115
<b>Capítulo VIII</b>	
<b>Anexos</b>	128

---



## *Capítulo I*

*Introdução e Revisão da Literatura*

---

O melanoma é neoplasia cutânea maligna originada dos melanócitos, células produtoras de melanina derivadas da crista neural, que na fase embrionária migram para a camada basal da epiderme e se diferenciam (Langley et al., 1999).

A incidência do melanoma aumentou nos últimos anos (Massi et al., 1999; Wang et al., 2001; Thompson, 2002; Schaffer et al., 2004). Segundo Schaffer et al. (2004) e Lens e Dawes (2004), ela dobrou nos últimos 25 anos e tem aumentado muito mais rapidamente do que qualquer outro câncer. Dados do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos mostram que em 1979 o melanoma era o 11º câncer mais freqüente entre os homens e o 10º entre as mulheres (National Cancer Institute, 2005). Em 2004, ele passou a ser o 5º câncer mais freqüente entre os homens e o 7º entre as mulheres (Schaffer et al., 2004). Na Austrália, atualmente o melanoma é o 4º tipo de câncer mais comum em homens e o 3º entre as mulheres (Lens e Dawes, 2004). No Brasil, de acordo com os dados de estimativa de câncer do INCA (Instituto Nacional do Câncer), o melanoma apresenta uma estimativa de 5820 casos novos para o ano de 2005, ocupando o 9º lugar entre os cânceres mais freqüentes em ambos os sexos (Brasil, 2004). O aumento da incidência é devido, principalmente, à mudança no padrão de exposição solar, que passou a ser intenso e intermitente, associado ao aumento da expectativa de vida (Hal et al., 1999; Schaffer et al., 2004). Estudos recentes demonstram o aumento do risco de desenvolver melanoma; em

---

1935, o risco era de 1 em 1.500 indivíduos nos Estados Unidos. Progressivamente o risco vem aumentando, passando para 1 em 600 em 1960, 1 em 105 em 1992, 1 em 87 em 1998, 1 em 75 em 2000, 1 em 67 em 2003, estimando-se risco de 1 em 50 em 2010 (Rigel et al., 1996; Hal et al., 1999; Langley et al., 1999). Segundo Geller et al. (2002) e Lens e Dawes (2004), a estimativa é de 53.000 diagnósticos de melanoma por ano em indivíduos norte-americanos. Embora estes números indiquem que o melanoma corresponde a apenas 3% dos cânceres de pele, ele é responsável por 60% das mortes por essa patologia (Crowson et al., 2001). Além disso, segundo Johnson et al. (1998), a agressividade do melanoma é responsável pela ocorrência de óbitos por esta neoplasia em idade mais precoce do que outros cânceres.

A mortalidade por melanoma também tem aumentado, embora em menor proporção que a incidência (Langley et al., 1999; Lens e Dawes, 2004). Essa diferença provavelmente se deve ao diagnóstico precoce, incentivado pelas campanhas de prevenção, proporcionando a identificação e o tratamento do melanoma nas suas fases iniciais (Hal et al., 1999; Massi et al., 1999; Schaffer et al., 2004). Dados do NCI (National Cancer Institute) indicam um aumento da sobrevida em 5 anos, de 82% em 1975 para 92% em 2000 para os melanomas invasivos. Além do aumento da sobrevida, tem sido observado na Europa Central um aumento na porcentagem de lesões finas ( $\leq 1$  mm), passando de 39% em 1976 para 65.5% em 2000 (Leiter et al., 2004). Nos Estados Unidos, os

---

melanomas “in situ” diagnosticados passaram de 9% em 1979 para 43% em 2004 (Schaffer et al., 2004). Esse aumento pode ser reflexo das campanhas de prevenção incentivando busca de lesões iniciais.

O diagnóstico melanoma nem sempre é facilmente suspeitado devido à diversidade de aspectos clínicos com que se apresenta.

Clinicamente o melanoma pode ser classificado em 4 subtipos:

**1)** Melanoma extensivo superficial – caracterizado clinicamente por mácula enegrecida, assimétrica, com formato irregular e presença de múltiplas cores, localizada em qualquer parte do corpo, preferencialmente no tronco em homens e no tronco e membros nas mulheres. Representa 70% dos melanomas (Hal et al., 1999).

**2)** Melanoma nodular – caracterizado clinicamente por nódulo enegrecido ou eritematoso (variante amelanótica) que surge em pele aparentemente sã ou sobre nevo pré-existente, em qualquer lugar do corpo. Representa 15% dos melanomas (Hal et al., 1999).

**3)** Melanoma lentiginoso acral – caracterizado clinicamente por lesão enegrecida localizada em extremidade, sendo mais freqüente em indivíduos da raça negra. Representa 10% dos melanomas (Hal et al., 1999).

---

4) Lentigo maligno melanoma – caracteriza-se clinicamente por mácula enegrecida em áreas fotoexpostas, geralmente de grande dimensão e longa evolução. Representa 5% dos melanomas (Hal et al., 1999; Langley et al., 1999).

Além da diferença clínica entre as lesões, o acometimento do melanoma é diferente entre os sexos. De acordo com Hal et al. (1999), entre 1973 e 1994 a incidência de melanoma foi maior em homens brancos do que em mulheres brancas. Freqüentemente ocorre na idade adulta (média de 40 anos ao diagnóstico) e raramente em crianças (Hal et al., 1999).

Quanto à localização, 43.5% dos melanomas ocorrem no tronco, 39.9% nos membros inferiores, 11.9% nas regiões palmo plantares e 10.7% na cabeça e pescoço (Crowson et al., 2001). Johnson et al. (1998), e outros autores descrevem predomínio das lesões no tronco para os homens e membros inferiores nas mulheres. Esse comportamento pode ser atribuído ao comportamento social distinto entre os sexos (Johnson et al., 1998; Langley et al., 1998; Hal et al., 1999).

O número crescente de casos, a evolução desfavorável desta neoplasia e a possibilidade de cura quando o diagnóstico é precoce, têm estimulado o desenvolvimento de diversos estudos visando a detecção de lesões iniciais, melhores indicadores prognósticos e novas perspectivas terapêuticas.

---

O diagnóstico anatomo-patológico desta neoplasia é dado pela identificação de critérios morfológicos padronizados na literatura (Crowson et al., 2001).

A progressão tumoral da maioria dos melanomas malignos abrange duas fases evolutivas identificáveis clínica e histologicamente: 1) Fase radial de crescimento e 2) Fase vertical de crescimento. A fase radial é caracterizada clinicamente por lesão macular. Histologicamente as células malignas podem estar restritas à epiderme ou atingir a derme papilar, denominando-se tumor microinvasivo. A lesão microinvasiva abrange tanto células agrupadas em pequenos ninhos como isoladas, apresentando citomorfologia semelhante àquelas intra-epidérmicas. Os ninhos dérmicos não excedem o tamanho de aqueles localizados na junção dermoepidérmica e não são observadas figuras de mitose. Nesta fase é comum o achado de infiltrado linfocitário na base da lesão podendo ser denso ou difuso. Quando o infiltrado linfocitário é denso, existe dificuldade em identificar as células melanocíticas por ele envolvidas, bem como em estabelecer os limites dérmicos da lesão (Clark et al., 1989; King et al., 2000; Scolyer et al., 2004). O próximo passo da progressão tumoral: a fase vertical de crescimento, representada clinicamente por pápula, nódulo ou tumoração, quando o melanoma invade francamente a derme, apresentando ninhos de melanócitos na derme papilar maiores do que os da epiderme (King et al., 2000; Crowson et al., 2001). Mitoses são freqüentemente observadas. Uma vez atingida a fase vertical, o

---

melanoma passa a apresentar potencial metastático (King et al., 2000; Scolyer et al., 2004).

A sobrevida dos indivíduos que apresentam melanoma invasivo é avaliada pela identificação de várias características presentes à microscopia óptica (Massi et al., 1999; Turthill et al., 2002). São elas: profundidade do tumor (nível de Clark), medida da espessura do tumor (Breslow), taxa mitótica, infiltrado inflamatório, presença ou ausência de regressão, invasão angiolifática e ulceração, dentre outras (Masson-Brahme et al., 1994; Clemente et al., 1996; Massi et al., 1999; King et al., 2000; Crowson et al., 2001; Thompson, 2002).

O principal indicador prognóstico é a profundidade da invasão tumoral na derme (Masson-Brahme et al., 1994; King et al., 2000). A relação entre o nível de invasão do melanoma e a sobrevida da doença foi observada inicialmente por Clark et al. em 1969. O autor subdividiu os melanomas em diferentes níveis de invasão de acordo com o compartimento anatômico da pele comprometido pela neoplasia:

- ✿ **Nível I** - Tumor restrito à epiderme,
  - ✿ **Nível II** - Infiltração da derme papilar por células tumorais isoladas ou agrupadas em pequenos ninhos, não excedendo o tamanho dos ninhos epidérmicos,
-

◆ **Nível III** – Grande número de células tumorais comprometendo a derme papilar, causando expansão desta para a derme reticular,

◆ **Nível IV** - Infiltração da derme reticular, e  
◆ **Nível V** - Invasão do tecido celular subcutâneo (Clark et al., 1969).

Breslow, em 1970, relacionou o prognóstico com a medida da espessura do tumor em milímetros, estabelecendo um método quantitativo, no qual a espessura do melanoma é medida da área mais superficial da camada granulosa ao ponto mais profundo da invasão dérmica (Breslow, 1970). A medida de Breslow, por ser mais precisa e menos sujeita a variações de interpretação, é adotada pela AJCC (American Joint Committee on Cancer) para o estadiamento dos melanomas, sendo o Nível de Clark utilizado como método complementar apenas para os melanomas menores que 1 mm na espessura de Breslow (Balch et al., 2001; Thompson, 2002; Thompson et al., 2004).

A medida da espessura de Breslow e a determinação do Nível de Clark são fatores importantes amplamente utilizados na avaliação da sobrevida (Masback et al., 2001). A medida da espessura do tumor (Breslow) é utilizada na definição da conduta cirúrgico-terapêutica bem como no estabelecimento da chance de recorrência da doença.

---

A medida de Breslow, embora seja objetiva e de prática realização, não é isenta de problemas. Dificuldades para estabelecer a medida exata do tumor se fazem presentes quando este apresenta áreas de regressão ou infiltrado linfocitário permeando as células tumorais e obscurecendo o limite da invasão dérmica.

A regressão histológica completa, de acordo com Gromet et al. (1978), com Elder et al. (1997) e com Crowson et al. (2001), é definida como área de fibrose dérmica sem células tumorais, com melanófagos, vasos neoformados, número variável de linfócitos e epiderme atrófica, limitada em ambos os lados pelo melanoma. No caso do tumor apresentar regressão, a medida de Breslow obtida pode não corresponder à real, levando a uma falsa idéia da espessura do tumor, e consequentemente subestimando o risco de metástase (Gromet et al., 1978; Massi et al., 1999; Taran e Heenan, 2001). Tal fato pode justificar a presença de metástase em casos de melanomas finos. Blessing et al. (1992) estudaram 110 casos de melanomas finos ( $\leq 1.5\text{mm}$ ) demonstrando presença de metástases em 3%. Todos os casos metastáticos apresentavam regressão histológica na lesão primária. Guitart et al. (2002) demonstraram através de estudo de 43 pacientes que a presença de regressão extensa é fator de risco para metástase em indivíduos com melanoma menor que 1mm. Taran e Heenan (2001) observaram que os 5 casos metastáticos de 1716 casos de melanomas finos (até 1mm) estavam associados à presença de regressão. Embora a

---

patogênese da regressão seja desconhecida, a presença de infiltrado inflamatório com linfócitos T e apoptose sugere resposta imunológica (Blessing et al., 1992).

Freqüentemente os melanomas finos apresentam infiltrado linfocitário. Quando localizado apenas na base da lesão, reflete pouca resposta do hospedeiro, não apresentando importância histológica estabelecida, sendo denominado inativo. Quando se observa células inflamatórias permeando as células tumorais, presença de apoptose ou ainda blocos de células melanocíticas em meio ao infiltrado linfocitário, caracteriza-se resposta do hospedeiro ao tumor, e o infiltrado é denominado ativo. Este achado tem significado prognóstico para a doença (Mansson-Brahme et al., 1994; Clemente et al., 1996; Busam et al., 2001; Crowson et al., 2001). Clark et al. em 1989 em um estudo de sobrevida observaram que a taxa de sobrevida em 8 anos para pacientes com melanoma com infiltrado inflamatório ativo na base da lesão (denominado “brisk” pelos autores) foi de 88.5%, representando maior sobrevida ao ser comparado com 75% de sobrevida para os casos de melanoma com infiltrado inflamatório inativo (“non brisk”) e 59.3% para os casos com ausência de infiltrado. Turthill et al. (2002) observaram melhor sobrevida em 5 anos para os indivíduos com infiltrado inflamatório ativo (100%) do que para aqueles com infiltrado não ativo (58%) e ausente (55%). Massi et al. (1999) demonstraram em estudo sobre parâmetros morfométricos e prognóstico que a medida do infiltrado peri e intra tumoral

---

são fatores de progressão nos melanomas finos. De acordo com King et al. (2000), a ausência de resposta linfocitária tem sido associada à diminuição da sobrevida.

O infiltrado linfocitário, quando representa resposta ativa do hospedeiro, é denso, podendo obscurecer o limite da invasão dérmica pelo tumor, dificultando o estabelecimento da espessura de Breslow (Ruiter et al., 2003). Não raramente, observam-se células tumorais em pequenos grupamentos em meio ao infiltrado. A presença de células melanocíticas malignas no infiltrado linfocitário é de difícil caracterização, podendo ser indistinguíveis dos melanófagos (Smoller, 2002; Jaffer et al., 2004; Mangini e Bhawan, 2002).

A imunohistoquímica, baseada no princípio da reação antígeno-anticorpo, proporciona a visualização de características celulares rotineiramente não identificáveis à histologia. Esse fato permite a caracterização histogenética, sendo considerada uma das ferramentas mais eficientes disponível ao patologista (Mangini e Bhawan, 2002; Smoller, 2002; Jaffer et al., 2004).

A identificação de células do melanoma pode ser feita pela imunomarcação pelo MELAN-A /MART-1, uma proteína citoplasmática de diferenciação, expressa em melanócitos adultos, neoplásicos ou não (Jungbluth et al., 1998; Mehregan et al., 2000; Ramirez-Montagut et al., 2000; Mangini e Bhawan, 2002; Gown e Bacchi, 2002; Smoller, 2002). Há

---

2 tipos de anticorpos monoclonais murinos contra essa proteína, o A 103 e o M2-7C10 , e são mais sensíveis que HMB-45 e mais específicos que S-100 para melanócitos e melanoma (Busan et al., 1998; Jungbluth et al., 1998; Fetsch et al., 1999; Bergman et al., 2000; Kelley et al., 2002; Xu et al., 2002; Jaffer et al., 2004; Yan e Brennick, 2004). Esses anticorpos podem ser usados na técnica de imunohistoquímica da Avidina – Biotina – Peroxidase pelo método indireto, que proporciona aumento da sensibilidade (Busan et al., 1998; Taylor et al., 2002; Jaffer et al., 2004). O uso da diaminobenzidina como cromógeno produz um pigmento marrom, de difícil distinção com a melanina (Orchard e Calonge, 1998). A contracoloração com Azure B foi descrita anteriormente para distinguir os melanófagos – corados em verde – nas neoplasias melanocíticas muito pigmentadas (Kamino, 1991).

A identificação precisa e caracterização imunofenotípica de eventuais células malignas no infiltrado linfocitário utilizando anticorpos monoclonais capazes de marcar melanócitos – MELAN-A/MART-1, HMB-45 e S-100 - definiriam mais precisamente os limites da lesão e aumentariam a precisão do Breslow, minimizando possível subestimação da medida da espessura e da verdadeira situação do paciente frente à doença.

---

## **REFERÊNCIAS\***

- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the american joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19:3635-48.
- Bergman R, Azzan H, Sprecher E, Manov L, Munichor M, Friedman-Birnbaum, et al. A comparative immunohistochemical study of MART-1 expression in spitz nevi, ordinary melanocytic nevi and malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42:496-500.
- Blessing K, McLaren KM. Histological regression in primary cutaneous melanoma: recognition, prevalence and significance. *Histopathology* 1992; 20:315-22.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2005: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2004.
- Busan KJ, Antonescu CR, Marghoob AA, Nehal KS, Sachs DL, Shia J, et al. Histologic classification of tumor-infiltrating lymphocytes in primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Clin Pathol* 2001; 115:856-60.

---

\* Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas biomédicas. *J Pediatr* 1997; 73: 213-24.  
National Library Of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2001. 248p.

---

Busan KJ, Chen YT, Old L, Stockert E, Iversen K, Keren A, et al. Expression of melan-A (MART-1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. Am J Surg Pathol 1998; 22:976-82.

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Ann Surg 1970; 172:902-8.

Clark WH, Fromm L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. Cancer Res 1969; 29:705-26.

Clark WH, Elder DE, Guerry DP, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. J Natl Cancer Inst 1989; 81:1893 -904.

Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurruda S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth fase of primary cutaneous melanoma. Cancer 1996; 77:1303-10.

Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. Malignant melanoma. In: The melanocytic proliferations: a comprehensive textbook of pigmented lesions. New York: Wiley-Liss; 2001. cap.10, p.281-397.

---

Elder D, Elenitsas R. Benign pigmented lesions and malignant melanoma.

In: Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, Johnson J. Lever's histopathology of the skin. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Raven; 1997. chap.29, p.625-84.

Fetsch PA, Marincola FM, Abati A. The new melanoma markers: MART-1 and MELA-A (the NIH experience). Am J Surg Pathol 1999; 23:607-10.

Gown AM, Bacchi CE. Diagnostic immunohistochemistry. In: Proceedings of the Meeting United States – Canadian Academy Of Pathology; 2002; Chicago. Chicago; 2002. 63p.

Geller AC, Cantor M, Miller DR, Kenaussis K, Rosseel K, Rutsch L, et al. The environmental protection agency's national sunwise school program: sun protection education in US schools (1999-2000). J Am Acad Dermatol 2002; 46:683-9.

Gromet MA, Epstein WL, Blois MS. The regressing thin malignant melanoma. Cancer 1978; 42:2282-92.

Guitart, J, Lowe L, Piepkorn M, Prieto VG Rabkin MS, Ronan SG, Shea CR, Tron VA, White W, Barnhill RL. Histological characteristics of metastasizing thin melanomas: a case-control study of 43 cases. Archf Dermatol 2002; 138:603-608.

---

Hall HI, Miller DR, Rogers JD, Bewerse B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40:35-42.

Jaffer S, Bleiweiss I. Beyond hematoxylin and eosin – the role of immunohistochemistry in surgical pathology. *Cancer Invest* 2004; 22:445-65.

Johnson TM, Dolan OM, Hamilton TA, Lu MC, Swanson NA, Lowe L. Clinical and histologic trends of melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38:681-6.

Jungbluth AA, Busan KJ, Gerald WL, Stockert E, Coplan KA, Iversen K, et al. A103 an anti Melan A monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. *Am J Surg Pathol* 1998; 22:595-602.

Kamino H, Tan ST. Immunoperoxidase technique modified by counterstain with azure B as a diagnostic aid in evaluating heavily pigmented melanocytic neoplasms. *J Cutan Pathol* 1991; 18:436-9.

Kelley LC, Starkus L. Immunohistochemical staining of lentigo maligna during mohs micrographic surgery using MART-1. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46:78-84.

---

King R, Googe PB, Mihm MC. Thin melanomas. Clin Lab Med 2000; 20:713-29.

Langley RGB, Barnhill RL, Mihm MC, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Neoplasms: Cutaneous melanoma. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolf K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, et al. Dermatology in general medicine. 5<sup>th</sup> ed. New York: Macgraw Hill; 1999. cap.92, p.1080-116.

Langley RGB, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Clinical characteristic. In: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ, editors. Cutaneous melanoma. 3<sup>rd</sup> ed. St Louis: Quality Medical Publishing; 1998. chap.5, p.81-102.

Leiter U, Buettner PG, Eigenthaler TK, Garbe C. Prognostic factors of thin cutaneous melanoma: an analysis of the central malignant melanoma registry of the german dermatological society. J Clin Oncol 2004; 22:3660-7.

Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. Br J Dermatol 2004; 150:179-85.

Mangini J, Li N, Bhawan J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions. A review of their diagnostic usefulness. Am J Dermatopathol 2002; 24:270-81.

---

Mansson-Brahme E, Carstensen J, Erhardt K, Lagerlöf B, Ringborg U, Rutqvist LE. Prognostic factors in thin cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 1994; 73:2324-32.

Masback A, Olsson H, Westerdahl J, Ingvar C, Jonsson N. Prognostic factors in invasive cutaneous malignant melanoma: a population-based study and review. *Melanoma Res.* 2001;11;5 :435-45.

Massi D, Franchi A, Borgognoni L, Reali UM, Santucci M. Thin cutaneous malignant melanoma. Identification of risk factors indicative of progression. *Cancer* 1999; 85:1067-76.

Mehregan DR, Hamzavi I. Staining of melanocytic neoplasms by melanoma antigen recognized by T cells. *Am J Dermatopathol* 2000; 22:247-50.

National Cancer Institute. Treatment option overview [cited 2005 out 20]. Available from:<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma>.

Orchard GE, Calonje E. The effect of melanin bleaching on immunohistochemical staining in heavily pigmented melanocytic neoplasms. *Am J Surg Pathol* 1998; 20: 357-61.

---

Ramirez-Montagut T, Andrews DM, Ihara A, Pervaiz S, Pandolfi F, Van Den Elsen PJ, et al. Melanoma antigen recognition by tumor-infiltrating T lymphocytes (TIL): effect of differential expression of Melan-A/MART-1. *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 11-8.

Rigel DS, Friedman RJ, Kopf AW. The incidence of malignant melanoma in United States: issues as we approach the 21<sup>st</sup> century. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34:839-47.

Ruiter DJ, Van Dijk MCRF, Ferrier CM. Current diagnostic problems in melanoma pathology. *Semin Cutan Med Surg* 2003; 22:33-41.

Schaffer JV, Rigel DS, Kopf AW, Bologna JL. Cutaneous melanoma – past, present and future. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51:65-9.

Scolyer RA, Thompson JF, Strech JR, Sharma R, McCarthy SW. Pathology of melanocytic lesions: new, controversial and clinically important issues. *J Surg Oncol* 2004; 86:200-11.

Smoller BR. Practical immunopathology of the skin. Totowa: Humana Press; 2002.

---

Taylor CR, Shi SR, Barr NJ, Wu N. Thechniques of Immunohistochemistry: principals, pitfals and standardization. In: Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry. New York: Churchill Livingstone; 2002. p. 3-44.

Taran JM, Heenan PJ. Clinical and histologic features of level 2 cutaneous malignant melanoma associated with metastasis. *Cancer* 2001; 91:1822-5.

Thompson JA. The revised american joint committee on cancer staging system for melanoma. *Semin Oncol* 2002; 29:361-9.

Thompson JF, Shaw HM, Hersey P, Scolyer RA. The history and future of melanoma staging. *J Surg Oncol* 2004; 86:224-35.

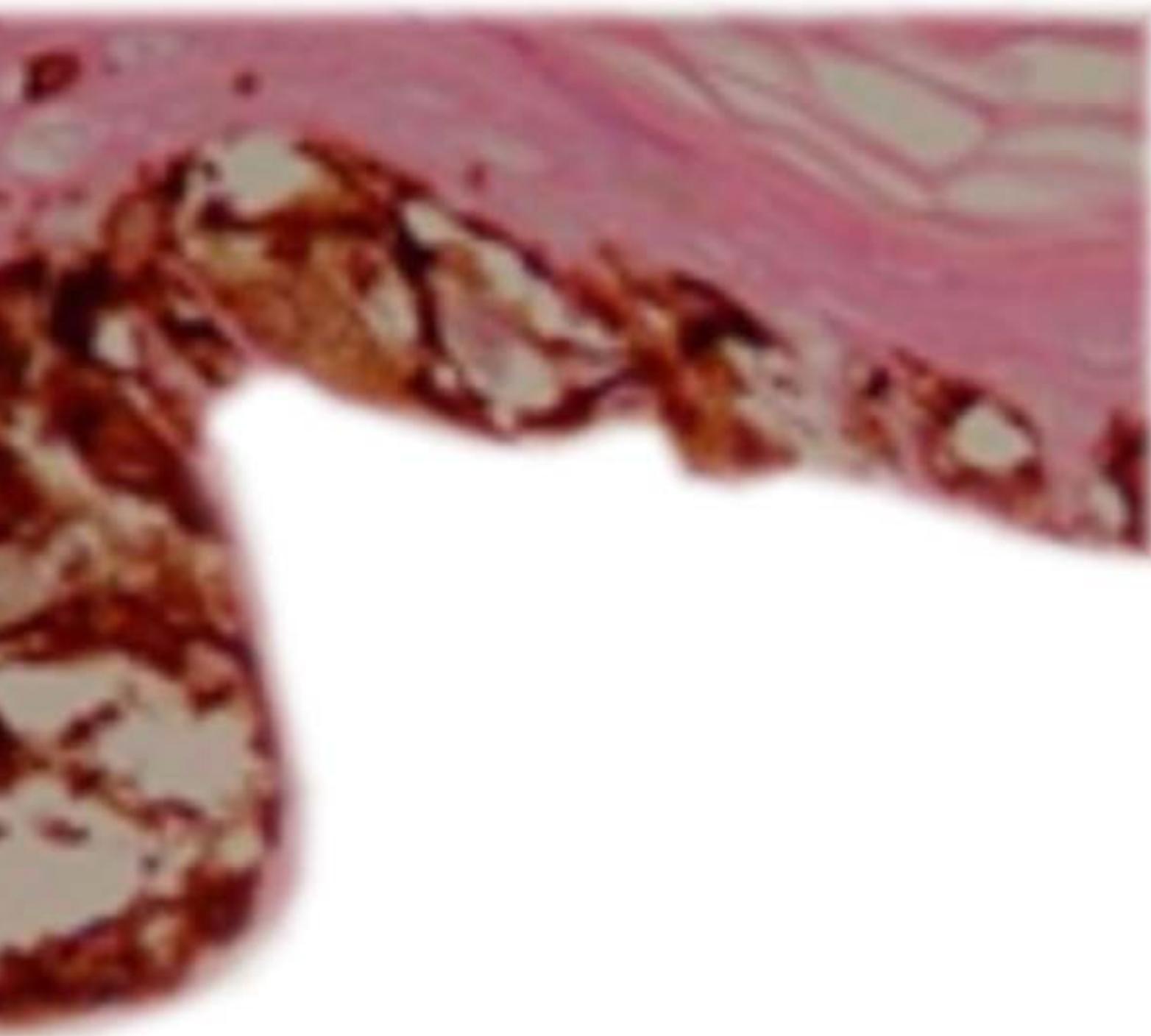
Turhill RJ, Unger JM, Liu PY, Flaherty LE, Sondak VK. Risk assesment in localized primary cutaneous melanoma: a southwest oncology group study evaluating nine factors and a test of the clark logistic regression prediction model. *Am J Clin Pathol* 2002; 118:504-11.

Wang SQ, Setlow R, Berwick M, Polsky D, Marghoob AA, Kopf AW, et al. Ultraviolet A and melanoma: a review. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44:837-46.

---

Xu X, Chu AY, Pasha TL, Elder DE, Zhang PJ. Immunoprofile of MITF, tyrosinase, Melan-A, and Mage-1 in HMB45 – negative melanomas. Am J Surg Pathol 2002; 26:82-7.

Yan S, Brennick JB. False-positive rate of the immunoperoxidase stains for MART1/MelanA in lymph nodes. Am J Surg Pathol 2004; 28:596-600.



## *Capítulo III*

*"Imunohistoquímica para identificação  
de células neoplásicas no infiltrado ativo  
de melanomas finos"*

---

\* Padronezado de acordo com as normas para publicação no Jornal Brasileiro de  
Patologia e Medicina Laboratorial.

## RESUMO

**Introdução:** Alguns melanomas finos apresentam denso infiltrado linfocitário ativo na base da lesão, onde freqüentemente existem melanófagos. A distinção entre o comprometimento da derme papilar pelo melanoma (Clark II) e a simples presença de melanófagos pode ser problemática, dificultando a caracterização do melanoma “*in situ*” (Clark I) ou microinvasivo (Clark II). O uso de marcadores específicos como MELAN-A pode não ser suficiente para determinação do nível de invasão, uma vez que a diaminobenzidina (DAB) marca as células positivas em marrom, confundindo positividade com pigmento melânico.

**Objetivos:** Utilização da imunohistoquímica (técnica da ABC) e contracoloração com Giemsa para distinção de melanócitos e melanófagos no infiltrado linfocitário ativo de melanomas finos.

**Material e Método:** 40 casos de melanoma “*in situ*” com infiltrado linfocitário ativo na base da lesão foram avaliados pela técnica de imunohistoquímica-ABC, anticorpo monoclonal MELAN-A e contracoloração pelo Giemsa.

**Resultados e Discussão:** A invasão dérmica foi caracterizada em 31 dos 40 casos estudados, pela presença de células MELAN-A positivas no infiltrado.

**Conclusão:** A simples modificação técnica pela contra coloração com Giemsa possibilita distinção entre melanócitos e melanófagos no infiltrado linfocitário, permitindo evidenciar microinvasão.

**Palavras-chave:** Melanoma, imunohistoquímica, melanófagos, infiltrado linfocitário ativo

## **ABSTRACT**

**Background:** Brisk infiltrating lymphocytes with melanophages are usually observed on thin melanomas. In these cases, sometimes it is difficult to distinguish melanocytes and melanophages in order to precise the level on invasion. Even decorating the melanoma cells by MELAN-A, it is still difficult to decide if there is microinvasion or not, because the brown pigment resulted from the technique is difficult to distinguish from the melanin of the melanophages.

**Material and Method:** Immunohistochemistry using MELAN-A and counterstain the tissue with Giemsa in 40 cases of “*in situ*” malignant melanomas with brisk infiltrating lymphocytes.

**Results and discussion:** Melanoma cells decorated by MELAN-A were founded in 31 of 40 cases. Using the Giemsa counterstain it was possible to distinguish the macrophages in green blue and melanoma cells in brown.

**Conclusions:** The present thecnique allowed to distinguish macrophages and melanoma cells, documenting the invasion and the exact tumor thickness.

**Key words:** melanoma, immunohistochemistry, melanophages, brisk infiltrating lymphocytes

## INTRODUÇÃO

Melanomas finos podem apresentar infiltrado linfocitário ativo na base da lesão dificultando a visualização dos seus limites<sup>3</sup>. A presença de células de melanoma isoladas no infiltrado inflamatório é de difícil caracterização, podendo ser confundidas com melanófagos<sup>6,11,15</sup>. A distinção entre o comprometimento da derme papilar pelo melanoma (Nível II de Clark) e a simples presença de melanófagos é importante para caracterização do melanoma “in situ” (Clark I) ou microinvasivo (Clark II)<sup>14</sup> e da necessidade da medida da espessura de Breslow.

O desenvolvimento dos anticorpos anti MELAN-A/MART-1 proporcionou melhora nos índices de sensibilidade e especificidade da imunohistoquímica no melanoma<sup>5,7,11,13,15</sup>. Esses anticorpos monoclonais reconhecem proteína específica de diferenciação melanocítica, expressa nos melanócitos benignos e malignos, sendo mais sensíveis e específicos que HMB-45 e S-100<sup>1,5,11,10</sup>.

Um dos fatores limitantes na utilização da imunohistoquímica para identificar células de melanoma no infiltrado linfocitário ativo dessas lesões, é a presença de pigmento de melanina tanto nas células melanocíticas, como melanófagos na derme. A melanina no citoplasma de macrófagos ou células do melanoma pode ser confundida com a imunomarcação pelo MELAN-A revelada pela coloração castanha do cromógeno diamino benzidina também localizada no citoplasma das células de melanoma no melanoma no infiltrado linfocitário<sup>12</sup>.

## **OBJETIVO**

A proposta deste trabalho é a identificação de células MELAN-A positivas no infiltrado linfocitário ativo de melanomas finos por imunohistoquímica com a técnica da streptavidina – biotina peroxidase (ABC) e contracoloração pelo GIEMSA.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados e incluídos no presente trabalho 40 casos de melanoma “in situ” dos arquivos do departamento de Patologia do Hospital Amaral Carvalho. Os casos obrigatoriamente apresentavam infiltrado linfocitário ativo obscurecendo os limites inferiores da lesão. Foram excluídos os casos com nevo melanocítico associado.

A coloração imunohistoquímica foi realizada em cortes histológicos de 4 µm de espessura, dispostos em lâminas histológicas previamente tratadas com o aderente poly-d-lysine, seguindo-se a técnica da ABC brevemente descrita a seguir. Foi feita a desparafinação em xiloglutaraldeído seguida da hidratação em solução aquosa de álcool etílico e lavagem com água. Após o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada a 3% por 10 minutos, os cortes histológicos foram colocados em solução de ácido cítrico a 0.01M, pH 6 e submetidos a temperatura de 121°C em ambiente de microondas por 15 minutos para a recuperação antigênica. Após descanso de 20 minutos incubou-se o anticorpo primário MELAN-A (Clone A103; Dako Corporation S.A.) na titulação de 1:100 por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após a lavagem das lâminas em solução salina tamponada, foram adicionados os reagentes secundário (Biotinilado anti-mouse Ba 2000-Vector) e terciário(ABC PK 6100 – Vector), incubando-se por 60 e 45 minutos respectivamente. A reação foi revelada com

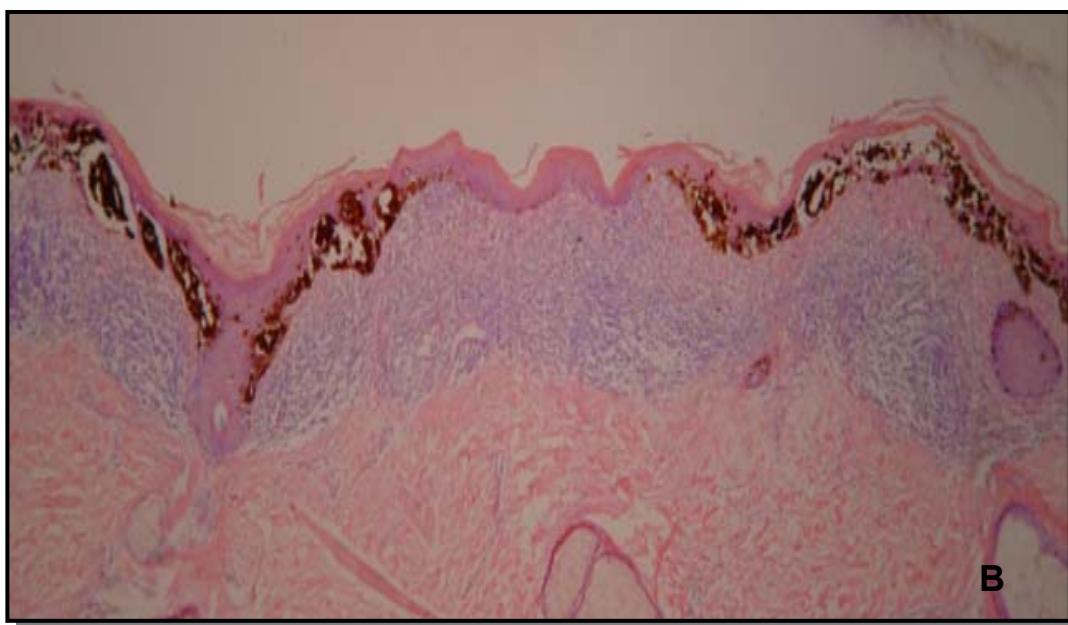
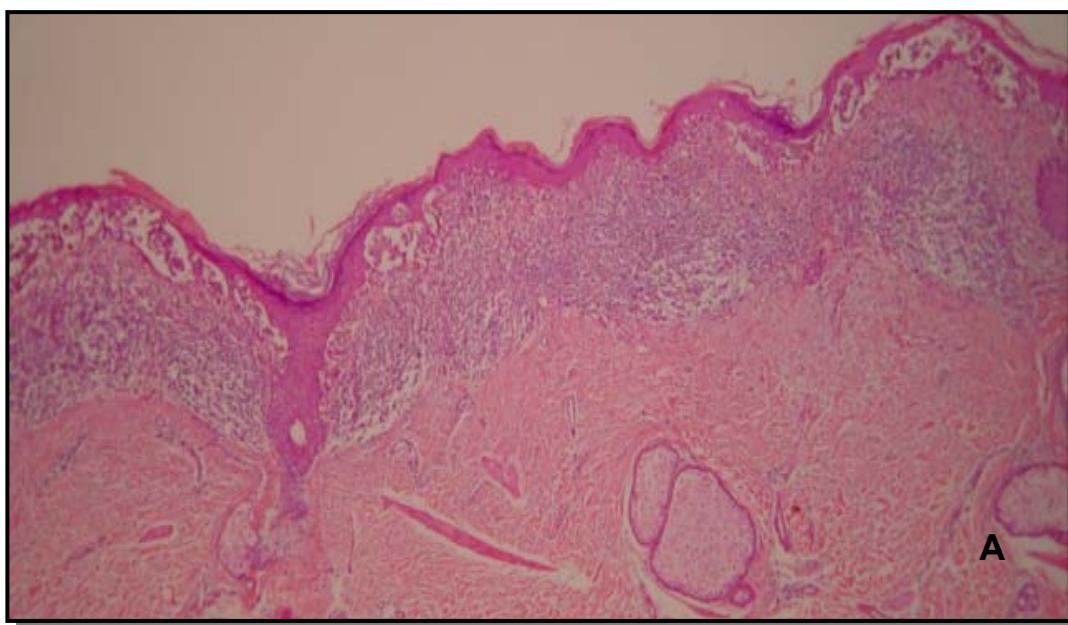
diaminobenzidina (Sigma Co., S. Louis, EUA) por 5 minutos e contracorada com Giemsa. Como controle negativo, omitiu-se o anticorpo primário, não sendo então evidenciada nenhuma marcação nos casos avaliados.

As lâminas coradas pelo MELAN-A foram examinadas ao microscópio óptico comum pelos autores (MEAM e AGS) para identificação de células MELAN-A positivas isoladas ou agrupadas no infiltrado inflamatório.

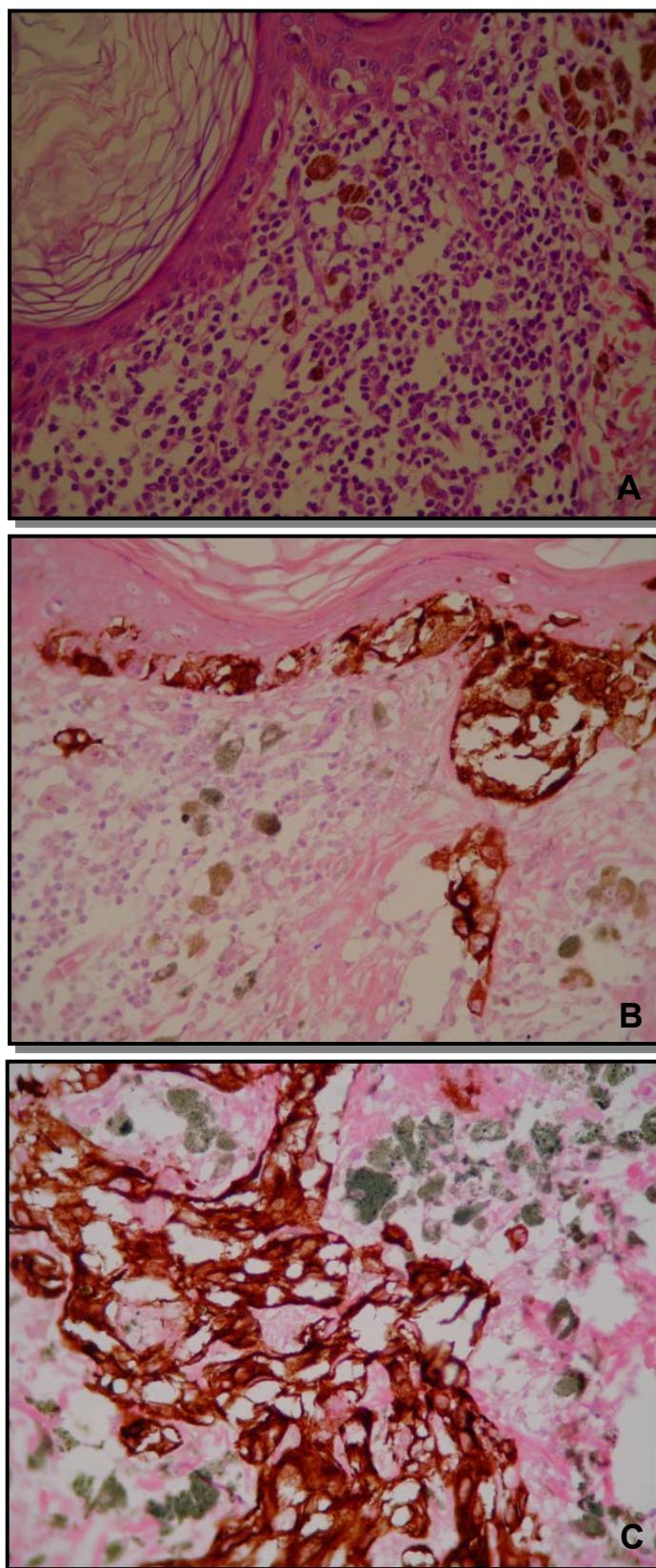
## **RESULTADOS**

Foram identificadas células de melanoma no infiltrado linfocitário ativo em 31 (77.5%) dos 40 casos estudados.

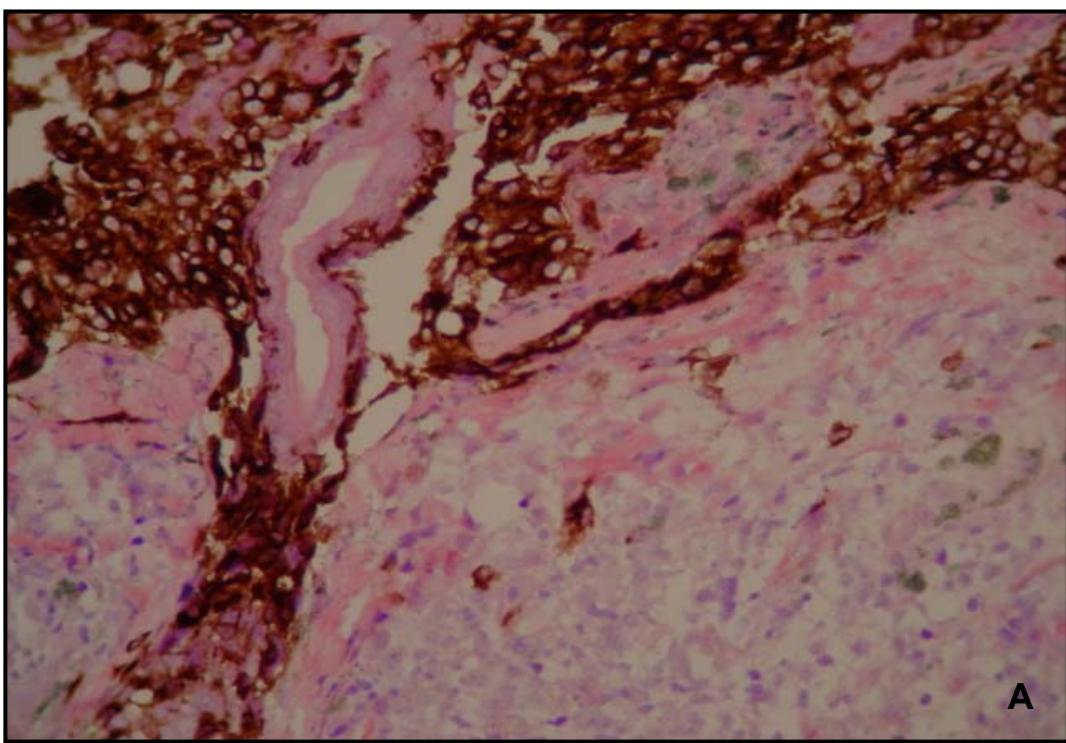
As figuras 1 a 4 demonstram alguns dos casos estudados com células de melanoma coradas pelo MELAN-A e melanófagos distintamente corados pela técnica da ABC. Células MELAN-A positivas foram coradas em marrom acastanhado com grânulos citoplasmáticos delicados e células melanofágicas coradas em azul esverdeado com grânulos citoplasmáticos grosseiros.



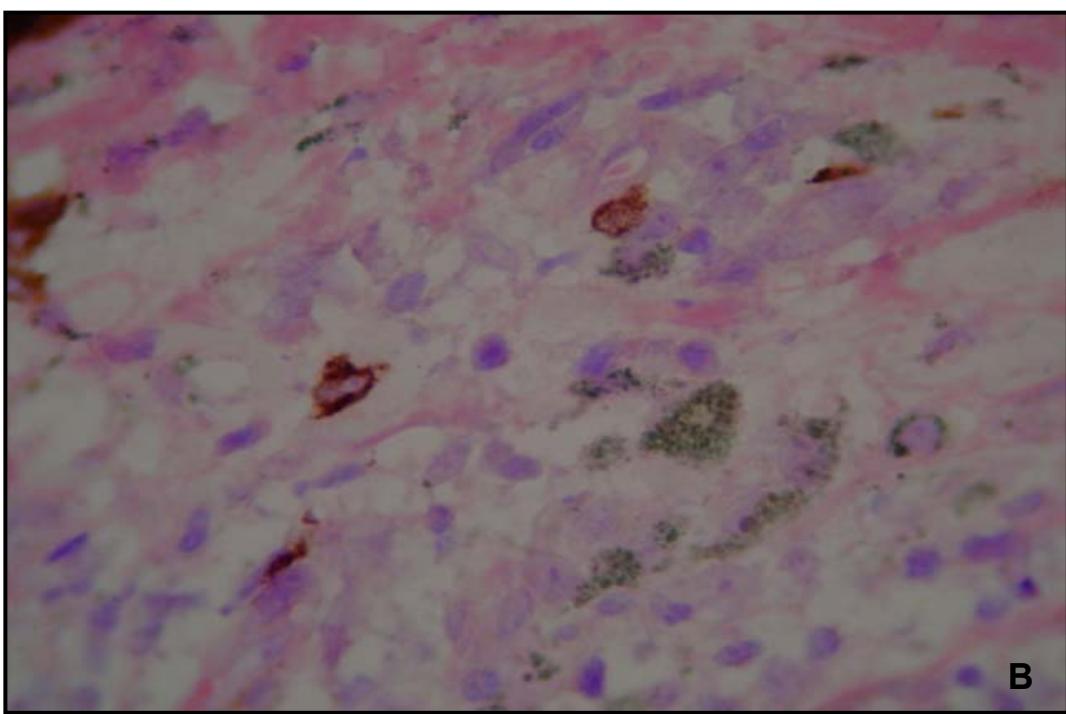
**Figura 1 - A)** Infiltrado linfocitário ativo dificultando a visualização dos limites do melanoma (H.E. 50x). **B)** Facilidade na determinação dos limites da lesão com a coloração pelo MELAN-A (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 50x).



**Figura 2 – A)** Dificuldade de distinção das células do melanoma no infiltrado linfocitário ativo (H.E. 400x) **B) e C)** Distinção entre célula de melanoma (marrom) e células macrofágicas (azul-esverdeado) (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 400x).

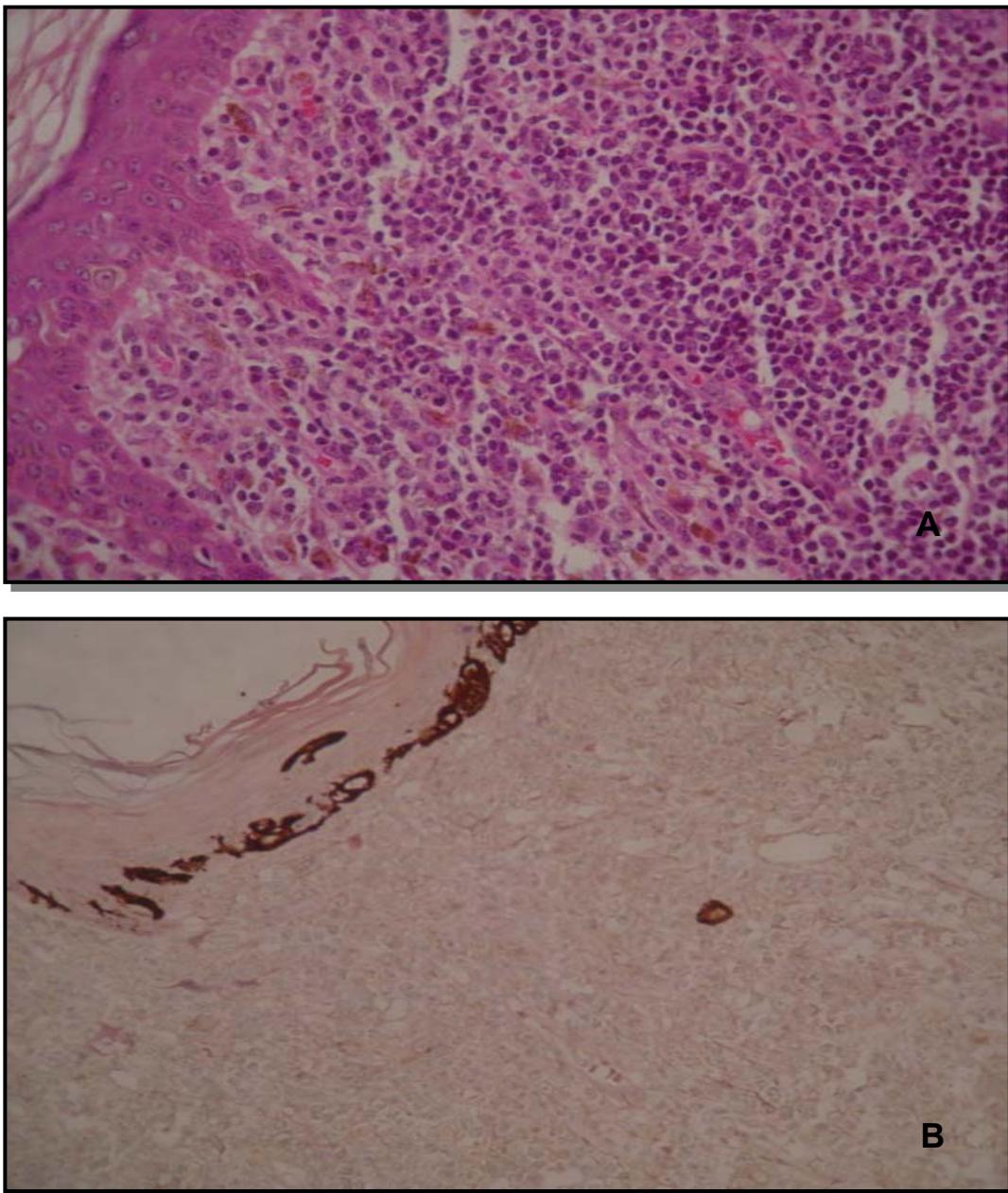


A

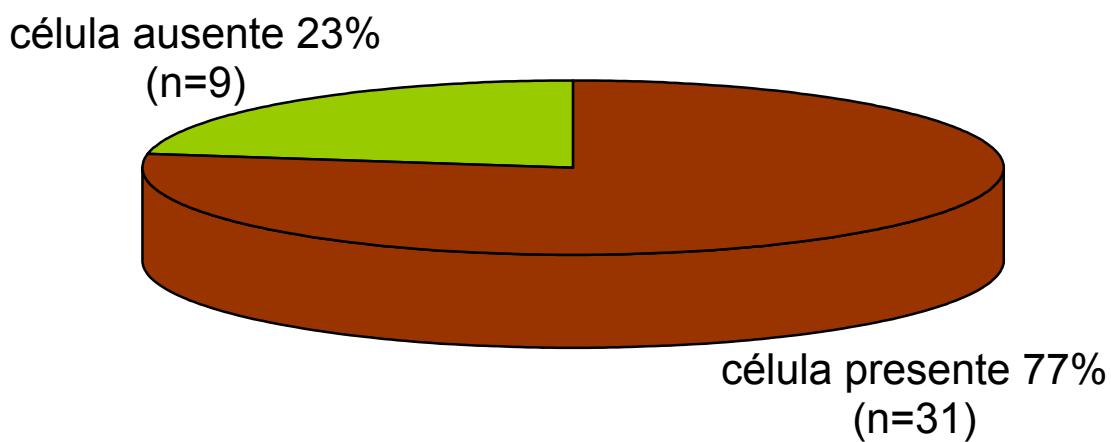


B

**Figura 3 – A)** Distinção entre melanócitos (marrom) e melanófagos (azul-esverdeado) (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 400x).  
**B)** Detalhe da figura 3A(Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 1000x).



**Figura 4 – A)** Infiltrado linfocitário ativo dificultando a precisão do nível de invasão dérmico(H.E. 400x). **B)** Presença de célula melanocítica no infiltrado, identificada pelo MELAN-A(Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 1000x).



**Figura 5** - Distribuição dos 40 casos de melanoma de acordo com a presença de células MELAN-A positivas infiltrado com a técnica de imunohistoquímica.

## **DISCUSSÃO**

O presente estudo realizou pesquisa de células de melanoma no infiltrado linfocitário ativo de 40 casos de melanomas “in situ”. A técnica utilizada foi a imunohistoquímica ABC com anti Melan-A e contra coloração com Giemsa.

Foram identificadas células Melan-A positivas em 31 de 40 casos (77,5%) “in situ”, demonstrando que 77,5% desses melanomas eram na realidade microinvasivos e portanto, devem ser submetidos à medida da espessura de Breslow e estadiados devidamente.

O presente estudo estabelece uma simples modificação técnica associada à imunohistoquímica que não altera a rotina da mesma no laboratório e permite a identificação da invasão inicial dérmica dos melanomas.

## **CONCLUSÃO**

A técnica de imunohistoquímica da ABC e contra coloração pelo Giemsa, pode ser utilizada para caracterização de células de melanoma MELAN-A positivas no infiltrado ativo de melanomas finos, para documentar microinvasão.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos Dr. Francisco C. Quevedo, Dr. Francisco Moraes Neto e Dr. Adauto J. Nunes do Serviço de Patologia do Hospital Amaral Carvalho pelo material usado.

Agradecimentos à FAPESP pelo auxílio pesquisa concedido ao estudo, processo nº 2003-00145-7.

Agradecemos aos técnicos Marcos Roberto Franchi, Celene Maria Carvalho Gandin e José Carlos Pedroso Lima pela padronização da técnica e confecção das lâminas.

## REFERÊNCIAS\*

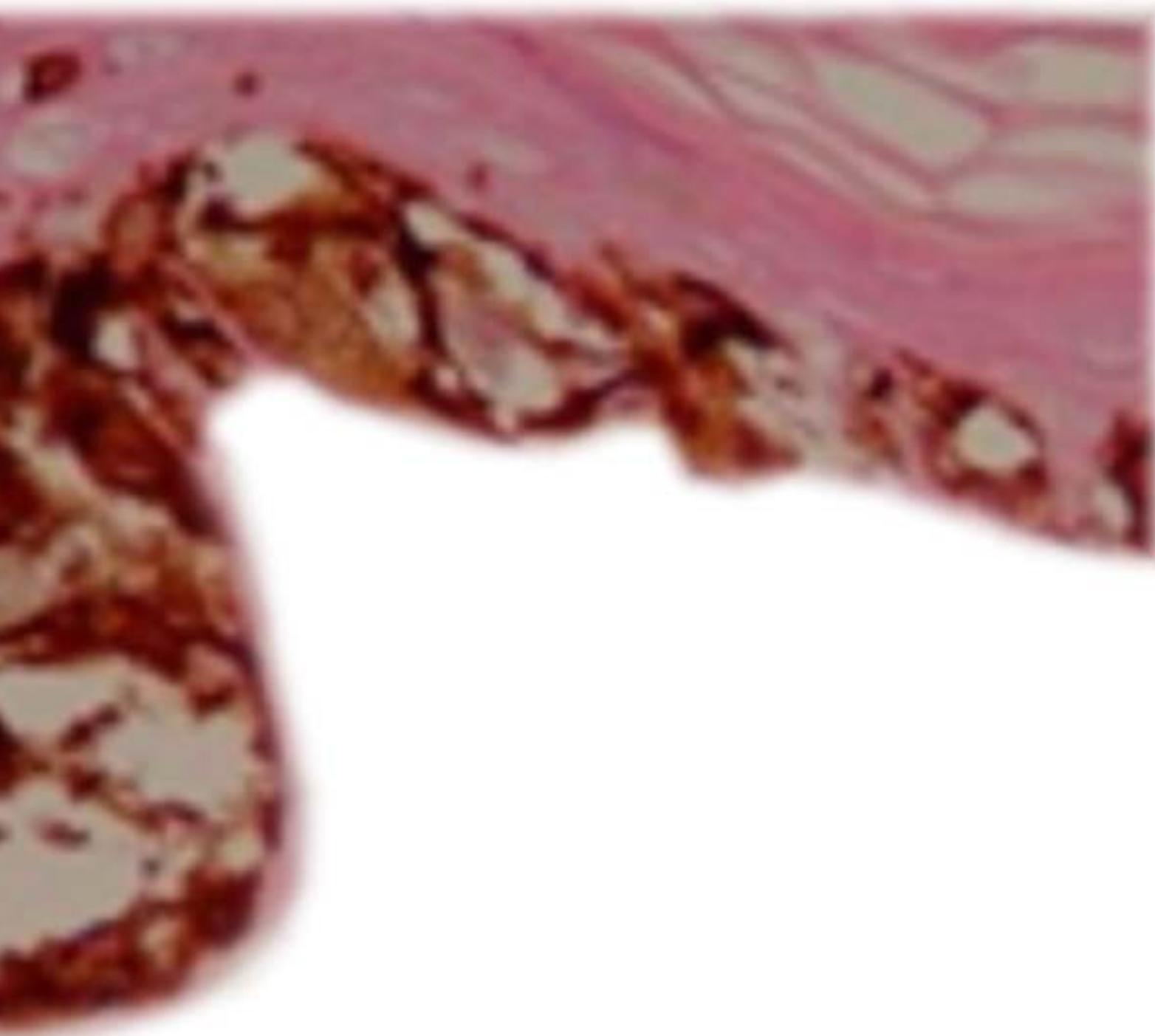
1. BERGMAN, R. et al. A Comparative Immunohistochemical Study of MART-1 Expression in Spitz Nevi, Ordinary Melanocytic Nevi and Malignant Melanoma. *J Am Acad Dermatol*, v. 42, n. 3, p. 496-500, 2000.
2. BRESLOW, A. Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Ann Surg*, v. 172, p. 902-908, 1970.
3. CROWSON, A. N.; MAGRO, C.M., MIHN, M.C. Malignant Melanoma. In: *The Melanocytic Proliferations: a Comprehensive Textbook of Pigmented Lesions*. New York: Wiley-Liss, 2001. Cap 10., p. 281-397.
4. ELDER, D; ELENITSAS, R. Benign Pigmented Lesions and Malignant Melanoma. In: ELDER, D; ELENITSAS, R; JAWORSKY, C; JOHNSON, J. *Lever's Histopathology of the Skin*. 8<sup>th</sup> ed. Lippincott Raven, 1997. Chap. 29, p.625-684.
5. GOWN, A.M.; BACCHI, C.E. Diagnostic Immunohistochemistry... . In MEETING UNITED STATES – CANADIAN ACADEMY OF PATHOLOGY, 2002, Chicago. *Proceedings...* Chicago, 2002. 63p.

---

\* Baseada na NBR-6023 de ago. de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

6. JAFFER, S.; BLEIWEISS, I. Beyond Hematoxylin and Eosin – The Role of Immunohistochemistry in Surgical Pathology. *Cancer Invest*, v.22, n. 3, p. 445-465, 2004.
7. JUNGBLUTH, A.A. et al. A103 An Anti Melan A monoclonal Antibody for the Detection of Malignant Melanoma in Paraffin-Embedded Tissues. *Am J Surg Pathol*, v. 22, n. 5, p. 595-602, 1998.
8. KAMINO, H.; TAN, S.T. Immunoperoxidase technique modified by counterstain with azure B as a diagnostic aid in evaluating heavily pigmented melanocytic neoplasms. *J Cutan Pathol*. v.18, p. 436-439, 1991.
9. KELLEY, L.C. & STARKUS, L. Immunohistochemical Staining of Lentigo Maligna During Mohs Micrographic Surgery Using MART-1. *J Am Acad Dermatol*, v. 46, n. 1, p. 78-84, 2002.
10. LOMUTO,M; CALABRESE,A.; GIULIANI, A. Prognostic signs in melanoma: state of the art. *Eur Acad Dermatol Venereol*, v. 18, p. 291-300, 2004.
11. MANGINI, J; LI, N.; BHAWAN, J. Immunohistochemical Markers of Melanocytic Lesions. A Review of Their Diagnostic Usefulness. *Am J Dermopathol*, v. 24, n. 3, p. 270-281, 2002.
12. ORCHARD, G.E.; CALONJE, E. The effect of melanin bleaching on immunohistochemical staining in heavily pigmented melanocytic neoplasms. *Am J of Surg Pathol*, v.20, n.4, p. 357-361, 1998.

13. RAMIREZ-MONTAGUT, T. et al. Melanoma Antigen Recognition by Tumor-Infiltrating T Lymphocytes (TIL): Effect of Differential Expression of Melan-A/MART-1. *Clin Exp Immunol*, v. 119, p. 11-18, 2000.
14. RUITER, D.J.; VAN DIJK, M.C.R.F.; FERRIER, C.M. Current diagnostic problems in melanoma pathology. *Semin Cutan Med Surg*, v.22, n.1, p. 33-41, mar 2003
15. SMOLLER, B. R. *Practical Immunopathology of th Skin*, Totowa, N.J., Humana Press, 2002
16. TAYLOR, C.R.; SHI, S.R.; BARR, N.J.; WU, N. Thechniques of Immunohistochemistry: Principals, Pitfals and Standardization. In: DABBS, D.J. *Diagnostic Immunohistochemistry*. Churchill Livingstone, 2002. Chap 1. p. 3-44.
17. XU, X.; CHU, A.Y.; PASHA, T.L.; ELDER, D.E.; ZHANG, P.J. Immunoprofile of MITF, tyrosinase, Melan-A, and Mage-1 in HMB45 – negative melanomas. *Am J of Surg Pathol*, v.26, n.1, p. 82-87, 2002.



## *Capítulo III*

*"Identification of neoplastic cells in  
the lymphocytic infiltrate associated  
to in situ melanomas"*

---

\*Padronizado de acordo com as normas para publicação na Revista Histopathology.

## **ABSTRACT**

In order to determine if patients diagnosed with “*in situ*” melanomas have tumor cells interspersed among the brisk lymphocytic infiltrate, the immunohistochemistry was conducted for Melan-A marker from 40 patients. A total of 31 (77.5%) out of a 40 cases had melanoma cells interspersed among the brisk lymphocytic infiltrate. The reactivity was heterogeneous, staining isolated cells within larger groups inside the lymphocytic infiltrate. On the basis of these positive findings, the Breslow’s thickness was recorded. As a consequence, the histological malignancy grading changed for higher grades. Taken together, such data support the notion that the immunohistochemistry may be an important tool in cases diagnosed with “*in situ*” melanomas by hematoxylin and eosin staining. This kind of approach could avoid misdiagnosis as well as to prevent poorer prognosis since the patient will receive the better treatment, follow-up and the real chances of recurrence will be explained.

**Keywords:** “*in situ*” melanoma, Melan-A, immunohistochemistry

---

## INTRODUCTION

Melanoma incidence has been increasing worldwide<sup>1,2,3,4,5</sup>. Owing to the use of sophisticated detection techniques as well as continuous skin health programs, a higher proportion of early lesions have been diagnosed in the last years<sup>1,5</sup>.

According to Clark et al. (1969), melanomas do not develop the capacity to metastize until they have formed an expansile tumor mass into the dermis, approaching the so called vertical growth phase (tumorigenic). The presence of single melanoma cells in the upper papillary dermis without forming an expansile dermal clone (micro invasive melanoma) is still regarded as radial phase (non-tumorigenic). When reporting a melanoma, it is essential to record the tumor thickness along with Clark's level, mitotic rate and the presence or absence of ulceration, lymph vascular invasion, perineural infiltration, regression and microsatelitosis<sup>6,7,8</sup>. Nevertheless, the presence of brisk category of lymphocyte extending across the entire base of the lesion may shelter malignant melanocytic cells<sup>9,10,11,12</sup>. Following the rationale that the tumor thickness is the dominant prognostic factor in determining risk for metastasis and prognosis for cutaneous melanomas<sup>13,14,15,16</sup>, the goal of this study was to perform the identification of melanoma cells interspersed among the brisk lymphocytic infiltrate associated to "in situ" melanomas by means of immunohistochemistry.

## MATERIALS AND METHODS

### Cases

All experimental protocols used in this study were approved by the Ethical Committee for Human Research, Botucatu Medical School, UNESP, SP, Brazil.

All specimens were retrieved from archival paraffin blocks in the Pathology Service of the Amaral Carvalho Hospital Jaú, SP, Brazil. The tissues had been fixed in 10% buffered formalin. A total of 40 cases of “*in situ*” melanomas with brisk lymphocytic infiltrate were selected for this study group.

### Histopathological evaluation

Tissue sections were deparaffinized through xylene and descending grades of ethanol, and stained for hematoxylin and eosin. Histopathologic diagnoses of “*in situ*” melanomas were assessed in all cases, according to the guidelines purposed by Clark et al. (1986), which included superficial spreading, lentigo maligna melanoma and acral lentiginous<sup>17</sup>. Occasional disagreements regarding the classification were discussed by the authors and a consensus reached.

---

### **Immunohistochemistry**

Tissue sections of 4 µm were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded ethanol, then pretreated in a microwave with 10mM citric acid buffer (pH = 6) for 3 cycles of 5 min each at 850 W for antigen retrieval. They were pre-incubated with 3% hydrogen peroxidase for 10 min for inactivation of endogenous peroxidase, and then blocked with 5% normal goat serum in PBS for 10 min. The specimens were then incubated with anti-Melan-A (clone A 103 Dako Corporation S.A., USA) at a concentration of 1:100 for 18 hours at 4°C. This was followed by two washes in PBS for 10 min. The sections were then incubated with biotin-conjugated secondary antibody anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) at a concentration of 1:200 in PBS for 1 h. After that, the sections were washed twice with PBS followed by the application of preformed avidin biotin complex conjugated to peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 45 min. The bound complexes were visualized by the application of a 0.05% solution of 3,3'-diaminobenzidine solution. In order to distinguish the melanin in the macrophage cytoplasm from the positive brown staining melanocytes, the slides were counterstained by Giemsa. For control studies of the antibodies, the serial sections were treated with mouse IgG in place of the primary antibody.

### **Analysis of Melan-A positive cells**

The sections were examined microscopically by the authors in conjunction (MEAM and AGS) in randomly selected microscopic fields at x400 magnification for single or nested positive cells interspersed among the lymphocytes. After that, the Breslow thickness was taken including the deepest cell observed on the Melan-A positive slides.

### **Statistical methods**

Statistical analyses were performed by the Chi Square test. Survival probabilities were developed by the Kaplan Meier method. Results were considered to be statically significant when p value was less than 0.05.

## RESULTS

“In situ” melanomas were obtained from 40 patients (21 females and 19 males) aged 25 to 90 years (mean age 57.5 years). The tumor site distribution was as follow: head and neck, 19 patients (47.5%); dorsal region, 7 patients (17.5%); upper limbs 8 patients (20%); lower limbs, 3 patients (7.5%); lower extremities 2 patients (5%); anterior trunk, 1 patient (2.5%) These data are detailed in Table 1. According to Clark’s level, all cases selected ranged from I to III (data not shown). The histological type of tumors revealed that 24 cases of total (60%) were classified as superficial spreading; 14 cases (35%) were recorded as lentigo maligno and 2 cases (5%) acral lentiginous melanoma (Figure 1).

A total of 31 (77.5%) out of a 40 cases initially classified as “in situ” melanomas had melanoma cells interspersed among the brisk lymphocytic infiltrate as depicted by immunohistochemistry (Table 1). The reactivity was heterogeneous, staining isolated cells within larger groups inside the lymphocytic infiltrate. Overall, no distinctive specific pattern of immunoreactivity could be detected (Figures 2, 3 and 4). Giemsa counterstaining allowed differentiation between melanophages and MELAN-A positive cells. The melanophages were identified by the presence of green blue granules on the cytoplasm (Figure 5). On the basis of immunohistochemical slides with Melan-A positive cells, the Breslow’s thickness was recorded. Thus, the clinical staging after

immunohistochemistry changed from 0 to IA in 29 cases (72.5%) and to IB in 2 cases (5%). Such data are summarized in Table 2.

The survival analysis according to the presence or not of melanoma cells interspersed among infiltrate did not show significance on Log-rank test ( $X^2=0.1585$ ,  $p>0.05$ ) (Figure 6).

## Tables

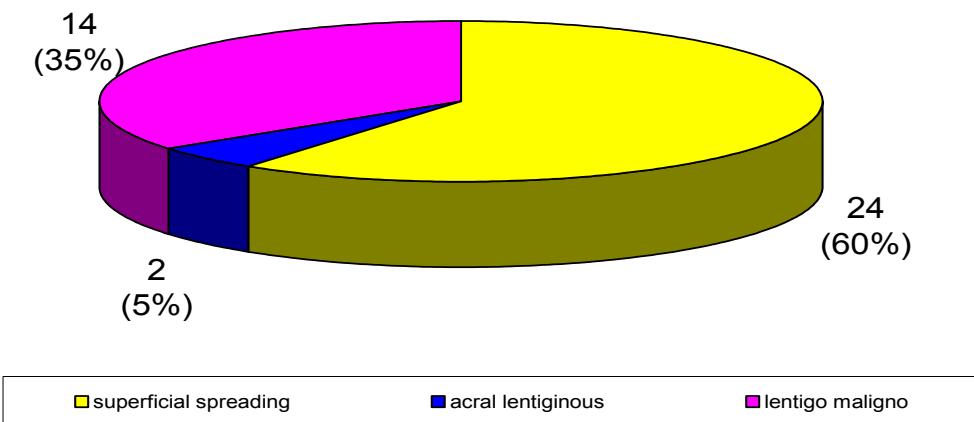
**Table 1** – Distribution of the 40 cases of “*in situ*” melanoma according to gender, age, anatomic site, histological type and presence of MELAN-A positive cell interspersed among brisk infiltrate.

PACIENT	GENDER	AGE	ANATOMICAL SITE	HISTOLOGICAL TYPE	MELAN-A POSITIVE CELL
1	M	41	head	superficial spreading	YES
2	M	90	head	lentigo maligno	YES
3	F	57	dorsal region	superficial spreading	YES
4	F	62	head	lentigo maligno	YES
5	M	68	dorsal region	superficial spreading	YES
6	F	50	head	superficial spreading	YES
7	F	85	lower extremities	acral lentiginous	YES
8	M	57	dorsal region	superficial spreading	YES
9	F	53	upper limbs	superficial spreading	YES
10	M	26	lower limbs	superficial spreading	NO
11	F	72	lower limbs	superficial spreading	YES
12	M	77	upper limbs	superficial spreading	YES
13	M	56	head	lentigo maligno	NO
14	F	80	head	superficial spreading	YES
15	F	25	head	lentigo maligno	YES
16	M	55	upper limbs	superficial spreading	YES
17	F	83	head	lentigo maligno	YES
18	F	60	dorsal region	superficial spreading	YES
19	M	33	dorsal region	superficial spreading	YES
20	M	67	head	lentigo maligno	YES
21	M	72	head	superficial spreading	YES
22	F	66	head	lentigo maligno	YES
23	F	47	upper limbs	superficial spreading	NO
24	M	75	head	superficial spreading	YES
25	M	73	head	lentigo maligno	YES
26	M	63	head	superficial spreading	YES
27	F	66	lower extremities	acral lentiginous	YES
28	F	51	upper limbs	superficial spreading	NO
29	F	71	upper limbs	lentigo maligno	YES
30	F	54	dorsal region	superficial spreading	YES
31	F	82	head	lentigo maligno	NO
32	M	72	head	lentigo maligno	NO
33	M	32	upper limbs	superficial spreading	NO
34	M	38	head	superficial spreading	YES
35	M	80	upper limbs	lentigo maligno	YES
36	M	70	anterior trunk	superficial spreading	NO
37	F	72	head	lentigo maligno	YES
38	F	73	head	lentigo maligno	YES
39	F	78	lower limbs	superficial spreading	YES
40	F	55	dorsal region	superficial spreading	NO

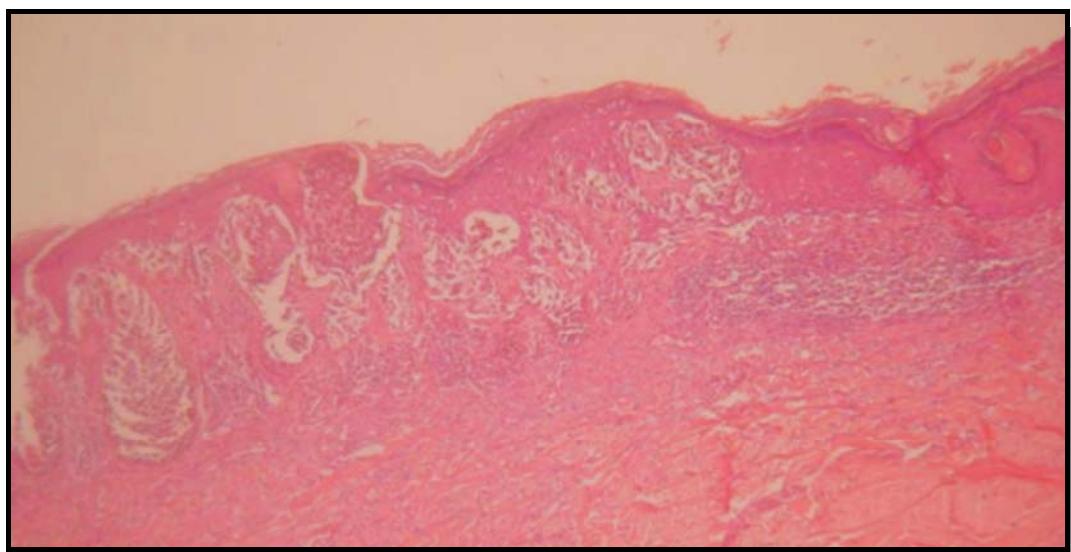
**Table 2** – Changes in clinical staging and Breslow thickness of the 40 cases of “*in situ*” melanoma after immunohistochemistry(IHQ).

PACIENT	BRESLOW THICKNESS AFTER IHQ	CLINICAL STAGING AFTER IHQ
1	0.25	IA
2	0.2	IA
3	0.35	IA
4	0.5	IA
5	0.35	IA
6	0.25	IA
7	1.7	IB
8	0.6	IA
9	0.25	IA
10	.	0
11	1.5	IB
12	0.2	IA
13	.	0
14	0.45	IA
15	0.25	IA
16	0.25	IA
17	0.22	IA
18	0.25	IA
19	0.6	IA
20	0.15	IA
21	0.3	IA
22	0.1	IA
23	.	0
24	0.3	IA
25	0.35	IA
26	0.38	IA
27	0.75	IA
28	.	0
29	0.2	IA
30	0.29	IA
31	.	0
32	.	0
33	.	0
34	0.4	IA
35	0.2	IA
36	.	0
37	0.15	IA
38	0.2	IA
39	0.3	IA
40	.	0

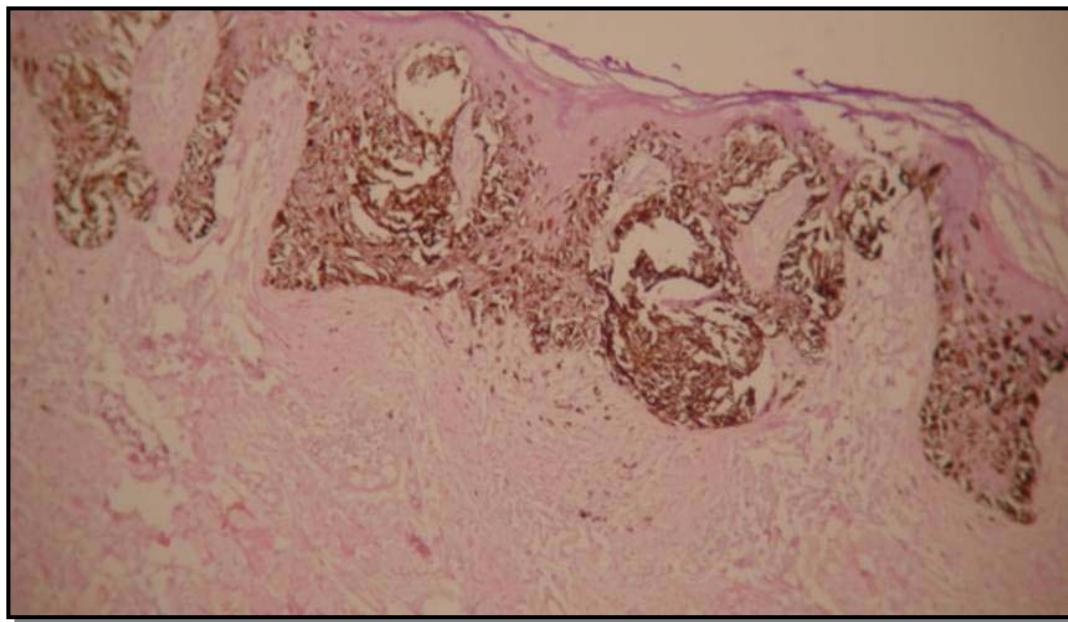
## Figures



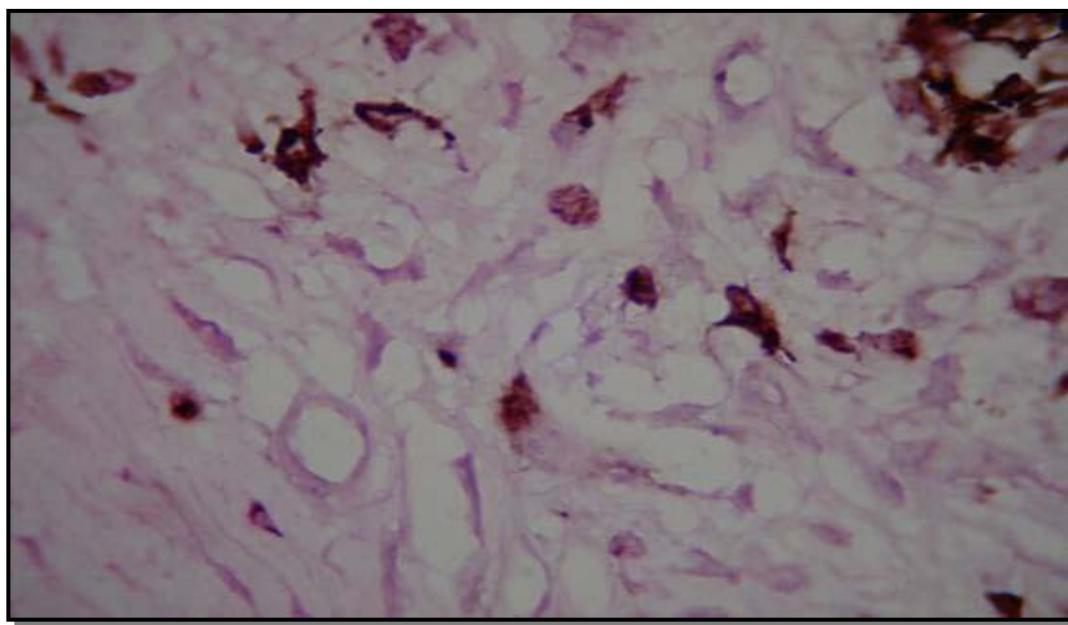
**Figure 1** - Distribution of the 40 cases of "in situ" melanoma according to histological type



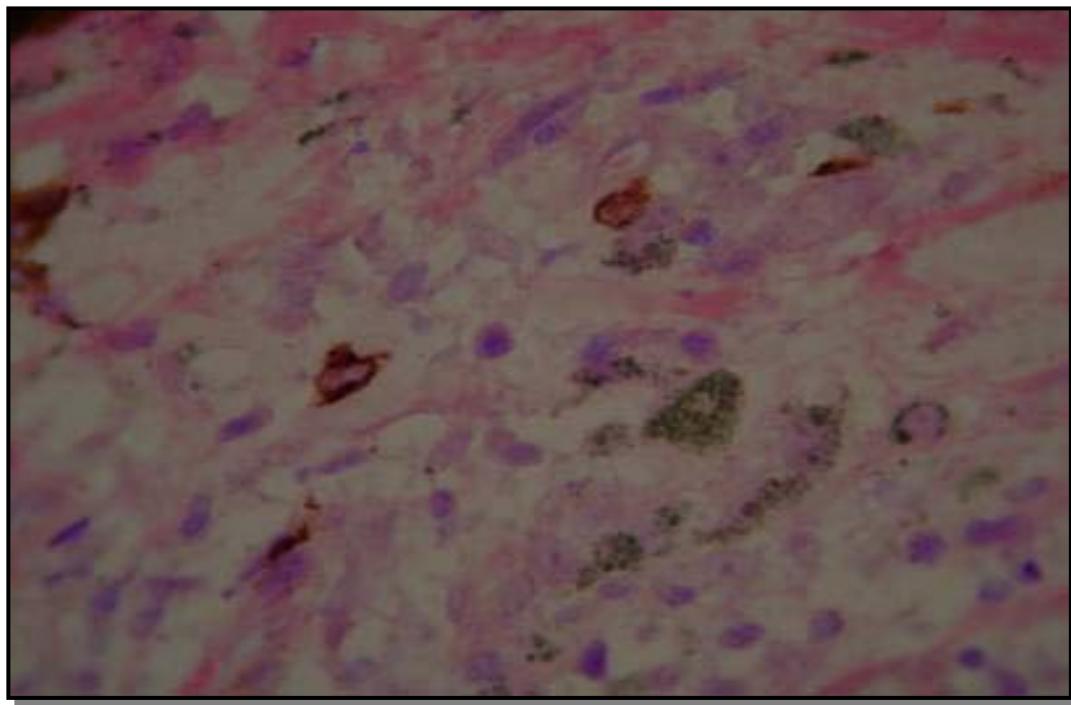
**Figure 2** – Melanoma "in situ" with brisk lymphocytic infiltrate (H.E. x100 magnification)



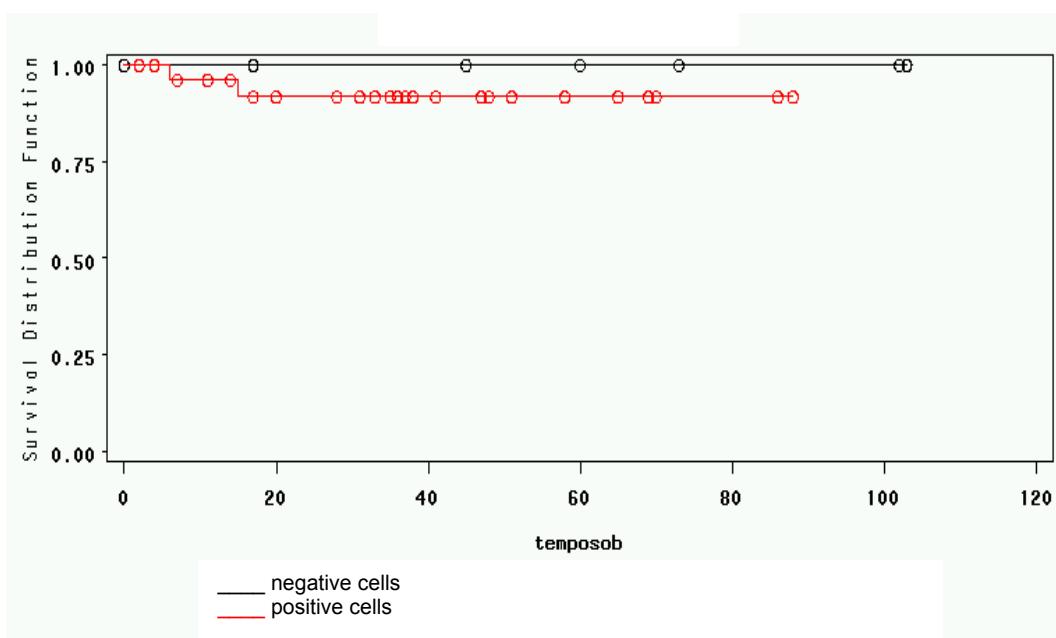
**Figure 3** – Identification of melanocytes Melan-A positive interspersed among the brisk lymphocytic infiltrate (ABC technique of immunohistochemistry counterstained for Giemsa x 100 magnification)



**Figure 4** – Melanocytes Melan-A positive interspersed among the brisk lymphocytic infiltrate (ABC technique of immunohistochemistry counterstained for Giemsa x 1000 magnification)



**Figure 5 –** Melanophages identified by the presence of green blue granules on the cytoplasm (ABC technique of immunohistochemistry counterstained for Giemsa x 1000 magnification)



**Figure 6 -** Survival analysis according to the presence or not of melanoma cells interspersed among infiltrate of the 40 cases of “*in situ*” melanoma

## DISCUSSION

Tumor thickness plays an important role with regard to prognostic factor for cutaneous melanoma<sup>14,15,16</sup>. However, the presence of brisk lymphocytic infiltrate and melanophages may impair the tumor thickness measurement as a result of difficulty to distinguish melanoma cells interspersed among brisk lymphocytic infiltrate<sup>9,10,11,12,18,19,20</sup>. Herein, a brisk category of lymphocytes extending across the entire base of the lesion blurring the limit could lead the pathologists to fail in distinguishing early lesions such as “*in situ*” and micro invasive melanomas<sup>8,9,21,22</sup>. In order to elucidate the plausibility of such a view, it seems appropriate to resort to the clinical study of the identification of neoplastic cells in the lymphocytic tumor infiltrate associated to “*in situ*” melanomas. Therefore, the aim of this study was to perform the identification of melanoma cells interspersed among the brisk lymphocytic infiltrate associated to “*in situ*” melanomas. For this, melanoma cells were identified using an immunohistochemical marker. The choice for Melan-A as the immunohistochemical marker was based on its advantage for identification and characterization of the melanoma cells. Melan-A has become widely used, especially in the identification of metastatic melanoma<sup>11,23</sup>. Melan-A expression was originally described to be lineage specific for melanocytes; however, labelling has also been found in non-melanocytic tumors, such as angiomyolipoma and in some steroid-

producing cells of the adrenal cortex, ovaries and testis<sup>23,24</sup>. Its sensitivity has been reported to be better compared with that of S-100 or HMB-45<sup>11,25</sup>. Some authors have argued that Melan-A is more sensitive marker for intra-epidermal melanocytes of normal skin than others<sup>26</sup>. Furthermore, counterstain with Azure B will impart a green color to melanin allowing the melanophages differentiation with accuracy<sup>18</sup>.

The approach used herein allowed a precise identification of melanomas cells interspersed among the lymphocytic infiltrate. A total of 77.5% of cases initially classified as “*in situ*” melanomas had melanoma cells interspersed among the brisk lymphocytic infiltrate being, therefore, re-classified as microinvasive melanomas. As a consequence, these neoplasms exhibited the Breslow thickness. It is conceivable that the patient with “*in situ*” melanoma must be treated with wide excision of primary tumor with a normal skin margins of 0.5 cm and follow up investigation once a year. By contrast, the patients presenting a 1 mm on thickness or less (T1) should be submitted to surgical margins of 1 cm and the follow up investigation raised for 2 to 4 visits by year<sup>27,28,29</sup>. Taken together there are seems to be evidence that melanoma cells may be present in the lymphocytic infiltrate associated to “*in situ*” melanomas supporting changes with respect to the microscopic diagnosis, the Breslow thickness, histological malignancy grading, surgical margins and follow-up. These results also emphasize because some cases of thin melanomas are able to develop recurrences and metastasis<sup>30,31,32</sup>.

---

Accumulating evidence suggests that melanoma recurrence and survival are taken at end points of 5 to 10 years. Longer follow-up is particularly important for patients with melanomas in early phases, because > 10% of recurrences in this population may occur after 10 years after diagnosis<sup>30,33,34</sup>. Although survival analysis was fairly limited in this study due to the reduced follow up, it is important to note that patients changes from stage 0 to IA drop from a 10 years survival of 100% to 88%<sup>3,15</sup>. In addition, the recurrence index is from 4 to 24%<sup>28,30,33</sup>.

Concluding, the results of the present study show that neoplastic cells may be present in the brisk lymphocytes infiltrate of “*in situ*” melanomas. The immunohistochemistry may be an important tool in these cases diagnosed by hematoxylin and eosin staining. This kind of approach could avoid misdiagnosis as well as to prevent poorer prognosis since the patient will receive the better treatment, follow-up and the real chances of recurrence will be explained.

### **Acknowledgements**

The authors thank Francisco C. Quevedo, Francisco Moraes Neto and Adauto J. Nunes, for providing the cases.

We are thankful to Marcos Roberto Franchi, Celene Maria Carvalho Gandin and José Carlos Pedroso Lima for technical assistance. This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant number 2003-00145-7).

## REFERENCES\*

1. Massi D, Franchi A, Borgognoni L, Reali UM, Santucci M. Thin cutaneous malignant melanoma. Identification of risk factors indicative of progression. *Cancer* 1999; 85:1067-76.
2. Wang SQ, Setlow R, Berwick M, Polsky D, Marghoob AA, Kopf AW, et al. Ultraviolet A and melanoma: a review. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44:837-46.
3. Thompson JA. The revised american joint committee on cancer staging system for melanoma. *Semin Oncol* 2002; 29:361-9.
4. Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2004; 150:179-85.
5. Schaffer JV, Rigel DS, Kopf AW, Bolognia JL. Cutaneous melanoma – past, present and future. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51:65-9.
6. Clark WH, Fromm L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969; 29:705-26.

\* International Committee of Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36-47.  
National Library Of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2001. 248p.

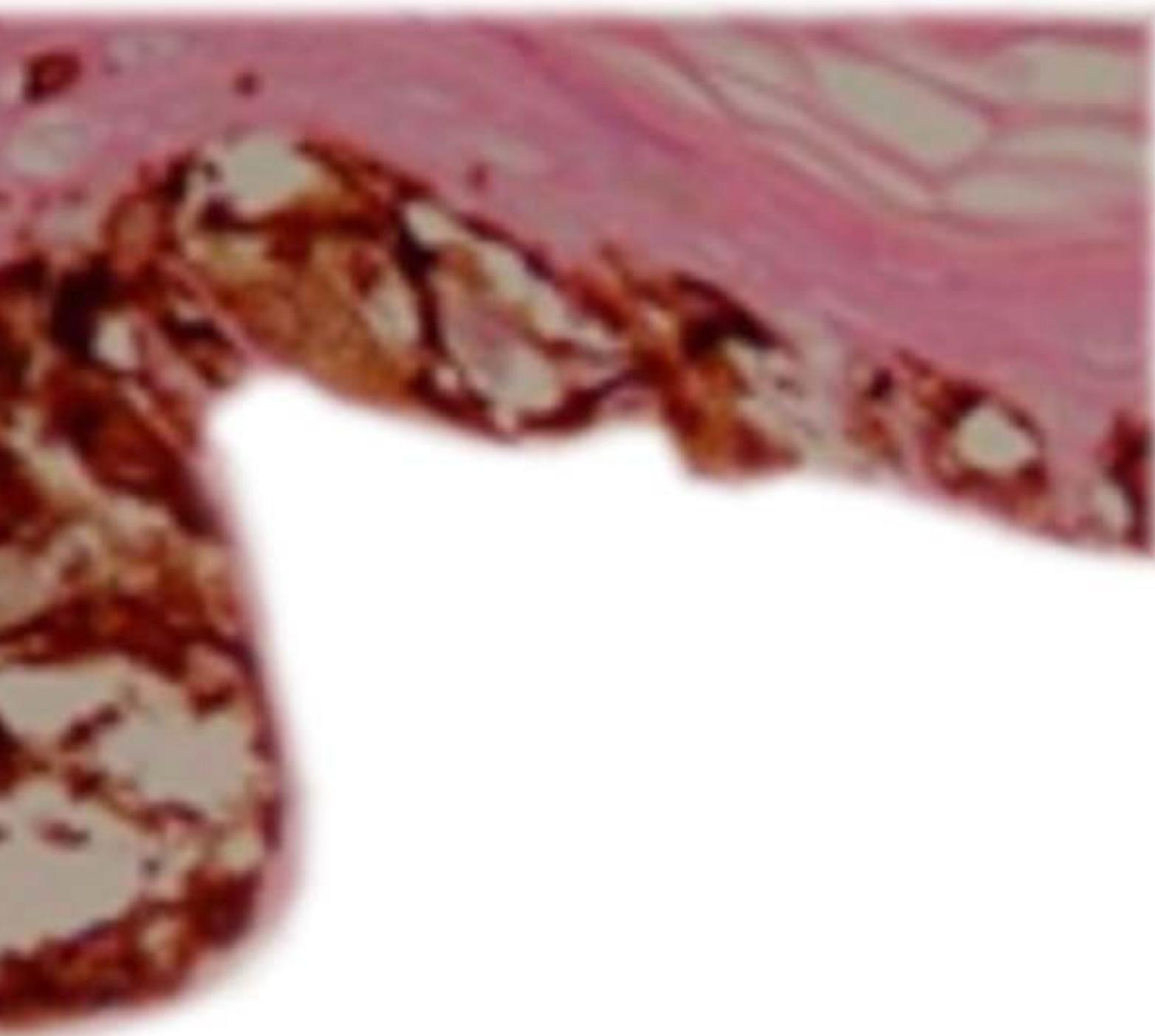
7. Scolyer RA, Thompson JF, Strech JR, Sharma R, McCarthy SW. Pathology of melanocytic lesions: new, controversial and clinically important issues. *J Surg Oncol* 2004; 86:200-11.
8. Zettersten E, Schaikl L, Ramirez R. Prognostic factors in primary cutaneous melanoma. *Surg Clin N Am*, 2003 ; 83:61-75.
9. Ruiter DJ, Van Dijk MCRF, Ferrier CM. Current diagnostic problems in melanoma pathology. *Semin Cutan Med Surg* 2003; 22:33-41.
10. Mangini J, Li N, Bhawan J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions. A review of their diagnostic usefulness. *Am J Dermatopathol* 2002; 24:270-81.
11. Smoller BR. Practical immunopathology of the skin. Totowa: Humana Press; 2002.
12. Jaffer S, Bleiweiss I. Beyond hematoxylin and eosin – the role of immunohistochemistry in surgical pathology. *Cancer Invest* 2004; 22:445-65.
13. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970; 172:902-8.

14. Soong SJ, Shaw HM, Balch CM, McCarthy WH, Urist MM, Lee JY. Predicting survival and recurrence in localized melanoma: a multivariate approach. *World J Surg.* 1992;16;2 :191-5.
15. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the american joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19:3635-48.
16. Masback A, Olsson H, Westerdahl J, Ingvar C, Jonsson N. Prognostic factors in invasive cutaneous malignant melanoma: a population-based study and review. *Melanoma Res.* 2001;11;5 :435-45.
17. Clark WH, Elder DE, Van Horn M. The biologic forms of malignant melanomas. *Hum Pathol*, 1986; 17;5: 443-50.
18. Kamino H, Tam ST. Immunoperoxidase technique modified by counterstain with azure B as a diagnostic aid in evaluating heavily pigmented melanocytic neoplasms. *J Cutan Pathol* 1991; 18:436-9.
19. Mehregan DR, Hamzavi I. Staining of melanocytic neoplasms by melanoma antigen recognized by T cells. *Am J Dermatopathol* 2000; 22:247-50.

20. Orchard GE, Calonje E. The effect of melanin bleaching on immunohistochemical staining in heavily pigmented melanocytic neoplasms. Am J Surg Pathol 1998; 20: 357-61.
21. Clark WH, Elder DE, Guerry DP, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. J Natl Cancer Inst 1989; 81:1893 -904.
22. Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth fase of primary cutaneous melanoma. Cancer 1996; 77:1303-10.
23. Jungbluth AA, Busan KJ, Gerald WL, Stockert E, Coplan KA, Iversen K, et al. A103 an anti Melan A monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. Am J Surg Pathol 1998; 22:595-602.
24. Xu X, Chu AY, Pasha TL, Elder DE, Zhang PJ. Immunoprofile of MITF, tyrosinase, Melan-A, and Mage-1 in HMB45 – negative melanomas. Am J Surg Pathol 2002; 26:82-7.
25. Clarkson KS, Sturdgess IC, Molyneux AJ. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan-A). J Clin Pathol. 2001;54;3:196-200.

26. Shabrawi-Caelen LE, Kerl H, Cerroni L. Melan-A: not a helpful marker in distinction between melanoma “in situ” on sun-damaged skin and pigmented actinic keratosis. *Am J Dermatopathol.* 2004;26;5:364-6.
  27. Jost LM. ESMO minimum clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow up of cutaneous malignant melanoma. *Ann Oncol* 2003; 14:1012-3.
  28. Francken AB, Bastiaannet E, Hoeksta HJ. Follow-up in patients with localized primary cutaneous melanoma. *Lancet Oncol* 2005; 6:608-21.
  29. National Cancer Institute. Treatment option overview [cited 2005 out 20]. Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma>.
  30. Kalady MF, Wuite RR, Johnson JL, Tyler DS, Seigler HF. Thin melanomas. Predictive lethal characteristics from a 30-year clinical experience. *Ann Surg* 2003; 238:528-37.
  31. Guitart, J, Lowe, L, Piepkorn, M. Histological characteristics of metastasizing thin melanomas: a case-control study of 43 cases. *Archf Dermatol* 2002; 138:603-608.
-

32. Lefreve M, Vergier B, Balme B, Thiebaut R, Delaunay M, Thomas L, Beyloy-Barry M, Machet L, Mureta A, Bioulac-Sagep P, Bailly C. Relevance of vertical growth pattern in thin level II cutaneous superficial spreading melanomas. Am J Surg Pathol, 2003;27;6: 717-724.
33. Moloney DM, Gordon DJ, Briggs JC, Rigby HS. Recurrence of thin melanoma: how effective is follow-up? Br J Plast Surg 1996; 49:409-13.
34. Crowley NJ, Seigler HF. Relationship between disease-free interval and survival in patients with recurrent melanoma. Arch Surg. 1992;127;11:1303-8.



## *Capítulo IV*

*"Expression of Melan-A positive  
cells in lymphocytic tumor infiltrate  
associated to microinvasive melanomas:  
role of the Breslow thickness"*

\*Padronizado de acordo com as normas para publicação na Revista Histopathology.

## ABSTRACT

It has been clearly demonstrated that the tumor thickness is the dominant prognostic factor in determining the risk of metastasis and prognosis for cutaneous melanomas. Nevertheless, the identification of melanoma cells inside lymphocytic tumor infiltrate of microinvasive tumors is still difficult to be categorized. In this regard, the aim of this study was to identify malignant cells associated to lymphocytic infiltrate in 30 cases diagnosed as micro invasive melanomas for correcting the tumor thickness as purposed by the Breslow index. The results showed that all cases displayed melanoma cells interspersed among the lymphocytic infiltrate as depicted by Melan-A positive cells. The reactivity was heterogeneous, staining isolated cells within larger groups inside the lymphocytic infiltrate. Furthermore, 17/30 cases (56,6%) showed an increased of the Breslow index. However, this increase failed for changing the histological grading significantly. Despite of immunomarker for Melan-A positive cells has increased the Breslow index in the majority of cases, this approach did not contribute for improving the prognosis as initially recorded by hematoxilin and eosin staining.

**Keywords:** microinvasive melanoma, Melan-A, immunohistochemistry

---

## INTRODUCTION

The incidence of cutaneous malignant melanomas has increased in human populations with a doubling time of 10-14 years<sup>1,2,3,4,5</sup>. Owing to the use of sophisticated detection techniques as well as continuous skin health programs, a higher proportion of early lesions have been diagnosed in the last years<sup>1,5</sup>.

In most patients, metastasis may occur within 2-5 years after the excision of primary tumours with tumor thickness > 1.5 mm<sup>6</sup>. It is well established that tumor thickness according to the Breslow's guideline is accepted as the best prognostic factor for primary cutaneous melanoma<sup>6,7,8,9</sup>. The risk of developing metastasis is proportionally correlated with tumor thickness.

Although survival in patients with thin melanomas in early phases is usually excellent<sup>6</sup>, the potential of these lesions to metastasize has recently been demonstrated<sup>10,11,12,13</sup>. Therefore, it is of considerable clinical interest to identify risk factors and to establish efficient follow-up in these troublesome cases. The presence of brisk category of lymphocytic infiltrate extending across the entire base of the lesion associated with the presence of melanophages may shelter malignant melanocytic cells<sup>14,15,16,17,18,19,20</sup>. As a result, the real tumor thickness will be masked. Because of this lack of information, the goal of this study was to perform the identification of melanoma cells interspersed among the brisk lymphocytic infiltrate associated to microinvasive melanomas for correcting the tumor thickness as purposed by the Breslow index.

## MATERIALS AND METHODS

### Cases selection

All experimental protocols used in this study were approved by the Ethical Committee for Human Research, Botucatu Medical School, UNESP, SP, Brazil.

All specimens were retrieved from archival paraffin blocks in the Pathology Service of the Amaral Carvalho Hospital Jaú, SP, and the Department of Pathology, Botucatu Medical School, UNESP, SP, Brazil. The tissues had been fixed in 10% buffered formalin. A total of 30 cases of thin melanomas less than 2 mm thick (Breslow) and Clark I to III, whose limits were blurred by a brisk lymphocytic infiltrate were selected for this study group.

### Histopathological evaluation

Tissue sections were deparaffinized through xylene and descending grades of ethanol, and stained with hematoxylin and eosin. Histopathologic diagnoses of thin melanomas were assessed as microinvasive melanomas, according to the guidelines purposed by Clark et al. (1969), which included superficial spreading, lentigo maligna melanoma and acral-lentiginous; tumor thickness according to the method

---

suggested by Breslow (1970) and histological regression, defined as one or more well-defined segments within the lesion where there is a marked reduction or absence of malignant melanocytes<sup>21,22,23</sup>. Occasional disagreements regarding the classification were discussed by the authors and a consensus reached.

### **Immunohistochemistry**

Tissue sections of 4 µm were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded ethanol, then pretreated in a microwave with 10mM citric acid buffer (pH = 6) for 3 cycles of 5 min each at 850 W for antigen retrieval. They were pre-incubated with 3% hydrogen peroxidase for 10 min for inactivation of endogenous peroxidase, and then blocked with 5% normal goat serum in PBS for 10 min. The specimens were then incubated with anti-Melan-A (clone A 103; Dako Corporation S.A.) at a concentration of 1:100 for 18 hours at 4°C. This was followed by two washes in PBS for 10 min. The sections were then incubated with biotin-conjugated secondary antibody anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) at a concentration of 1:200 in PBS for 1 h. After that, the sections were washed twice with PBS followed by the application of preformed avidin biotin complex conjugated to peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 45 min. The bound complexes were visualized by the application of a 0.05% solution of 3-3'-diaminobenzidine solution. In

order to distinguish the melanin in the macrophage cytoplasm from the positive brown staining melanocytes, the slides were counterstained by Giemsa. For control studies of the antibodies, the serial sections were treated with mouse IgG in place of the primary antibody.

### **Analysis of Melan-A positive cells**

The sections were examined microscopically by the authors in conjunction (MEAM and AGS) in randomly selected microscopic fields at x400 magnification for single or nested positive cells interspersed among the lymphocytes. After that, the Breslow thickness was taken including the deepest cell observed on the Melan-A slides. These data were compared with the Breslow's thickness on the H.E. sections measured previously.

### **Statistical methods**

Statistical analyses were performed by the Chi Square test. Results were considered to be statically significant when p value was less than 0.05.

## RESULTS

Thin melanomas were obtained from 30 patients (17 females and 13 males) aged 12 to 93 years (mean age 52.5). The tumor site distribution was as follow: head and neck 4 patients (13%); dorsal region, 12 patients (41%); upper limbs, 4 patients (13%); lower limbs 5 patients (17%); anterior trunk 4 patients (13%); lower extremities 1 patient (3%). The Stage grouping was performed, resulting that 24 cases were clinical stage IA (24%); 5 cases were clinical stage IB (17%) and 1 case was clinical stage IIIA. With accord to Clark's level, all cases selected ranged from I to III (data not shown). The histological classification revealed 27 cases of superficial spreading melanoma (90%); 2 cases of lentigo maligno (7%) and 1 case of acral lentiginous melanoma (3%). Moreover, 13 of 30 cases of microinvasive melanomas (34.28%) presented histological regression.

These data are summarized on Table 1.

In 23 cases of total (77%) there were melan-A positive cells interspersed among the lymphocytic infiltrate. The reactivity was heterogeneous, staining isolated cells within larger groups inside the lymphocytic infiltrate. Overall, no distinctive specific pattern of immunoreactivity could be detected (Figure 1, 2 and 3). In the majority of cases, the Breslow's thickness was increased as well (17 cases). However, the clinical staging was not altered significantly. These findings are listed in Table 2.

## Tables

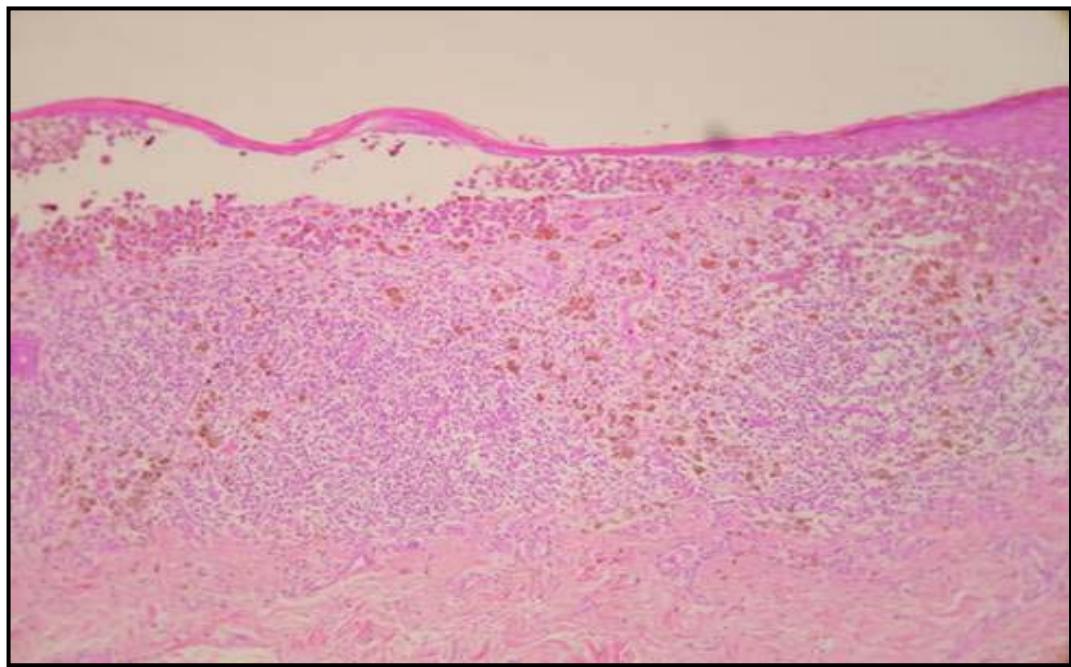
**Table 1 –** Distribution of the 30 cases of microinvasive melanoma according to gender, age, anatomic site, histological type, clinical staging, presence of histological regression and presence of MELAN-A positive cells after immunohistochemistry.

CASE	GENDER	AGE	ANATOMIC SITE	HISTOLOGICAL TYPE	CLINICAL STAGING	REGRESSION	POSITIVE CELLS
1	M	67	anterior trunk	superficial spreading	I B	YES	YES
2	M	43	dorsal region	superficial spreading	I A	YES	YES
3	M	31	dorsal region	superficial spreading	I A	YES	NO
4	F	48	dorsal region	superficial spreading	I A	YES	YES
5	F	55	lower limb	superficial spreading	I A	YES	YES
6	F	50	dorsal region	superficial spreading	I A	YES	NO
7	F	68	lower limb	superficial spreading	I A	NO	NO
8	M	41	anterior trunk	superficial spreading	I A	YES	NO
9	F	54	lower limb	superficial spreading	I A	NO	NO
10	F	55	lower limb	superficial spreading	I A	YES	YES
11	F	45	dorsal region	superficial spreading	I A	NO	YES
12	M	19	dorsal region	superficial spreading	I A	NO	YES
13	F	80	upper limb	superficial spreading	I A	NO	YES
14	F	64	head	superficial spreading	I A	NO	YES
15	M	26	dorsal region	superficial spreading	I A	NO	YES
16	F	66	upper limb	superficial spreading	I A	NO	NO
17	F	48	upper limb	superficial spreading	I A	YES	YES
18	M	44	head	superficial spreading	III A	NO	NO
19	F	19	anterior trunk	superficial spreading	I A	NO	YES
20	M	35	dorsal region	superficial spreading	I A	NO	YES
21	F	44	dorsal region	superficial spreading	I B	YES	YES
22	F	30	lower limb	superficial spreading	I B	YES	YES
23	M	47	dorsal region	superficial spreading	I B	NO	YES
24	M	64	upper limb	superficial spreading	I A	YES	YES
25	F	93	lower extremities	acral lentiginous	I A	NO	YES
26	M	87	head	lentigo maligno	I A	NO	YES
27	F	12	dorsal region	superficial spreading	I A	NO	YES
28	M	39	dorsal region	superficial spreading	I B	NO	YES
29	M	76	head	lentigo maligno	I A	NO	YES
30	F	49	anterior trunk	superficial spreading	I A	YES	YES

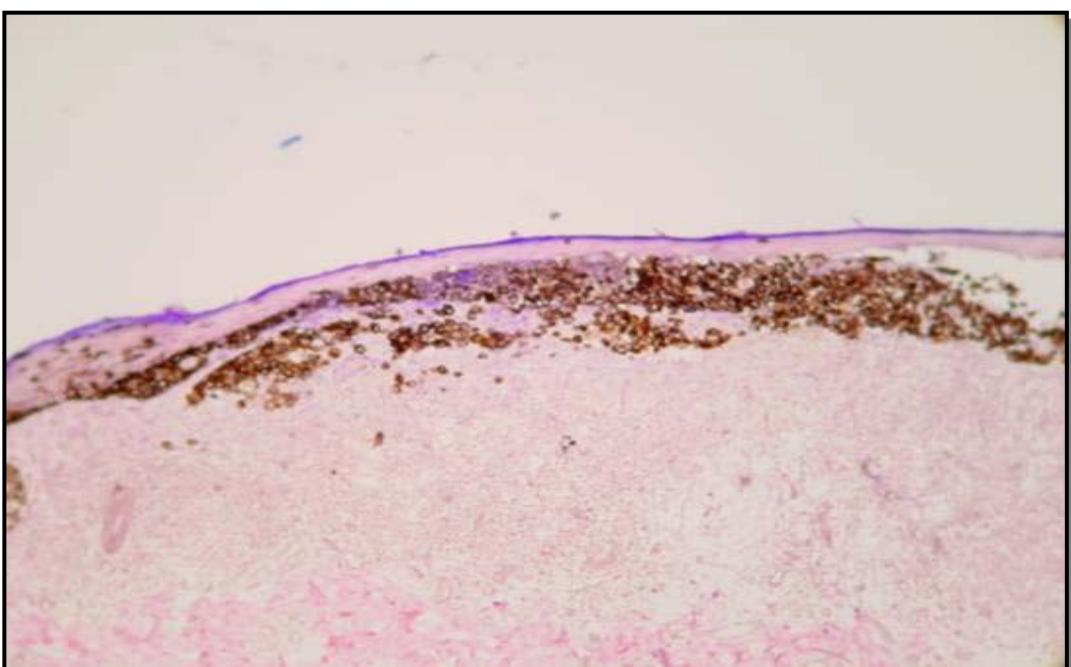
**Table 2** – Comparison between clinical staging before and after immunohistochemistry(IHQ)

CASE	BRESLOW HE	CLINICAL STAGING	BRESLOW AFTER IHQ	CLINICAL STAGING AFTER IHQ
1	0.31	I B	0.45	I B
2	0.5	I A	0.5	I A
3	0.5	I A	0.5	I A
4	0.1	I A	0.2	I A
5	0.68	I A	0.7	I A
6	0.57	I A	0.57	I A
7	0.95	I A	0.95	I A
8	0.62	I A	0.62	I A
9	0.51	I A	0.51	I A
10	0.45	I A	0.6	I A
11	0.14	I A	0.3	I A
12	0.76	I A	0.95	I A
13	0.68	I A	0.68	I A
14	0.15	I A	0.5	I A
15	0.35	I A	0.42	I A
16	0.45	I A	0.45	I A
17	0.63	I A	0.7	I A
18	0.25	III A	0.25	III A
19	0.45	I A	0.45	I A
20	0.84	I A	1	I A
21	0.36	I B	0.4	I B
22	0.63	I B	0.63	I B
23	1.12	I B	0.63	I B
24	0.25	I A	0.3	I A
25	1	I A	1.3	IB
26	0.8	I A	2	IB
27	0.40	I A	0.6	I A
28	1	I B	2.35	IIA
29	0.4	I A	0.4	I A
30	1.4	I A	1.42	I A

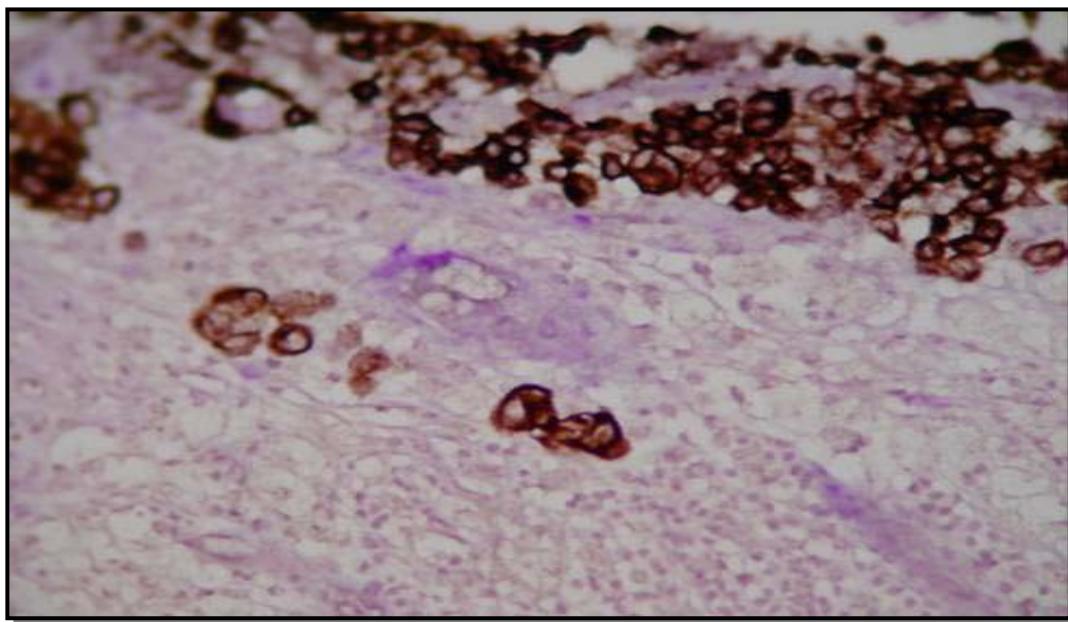
## Figures



**Figure 1** – Case 21: Melanoma 0.36mm of Breslow presenting brisk lymphocytic infiltrate and melanophages (H.E. x 100 magnification).



**Figure 2** – Case 21: Identification of melanocytes MELAN-A positive interspersed among the brisk lymphocytic infiltrate (ABC technique of immunohistochemistry counterstained for Giemsa x 100 magnification)



**Figure 3** – Case 21: Melanocytes MELAN-A positive interspersed among the brisk lymphocytic infiltrate (ABC technique of immunohistochemistry counterstained for Giemsa x 400 magnification)

## DISCUSSION

Accumulating evidence suggests that thin melanomas represent better prognosis than others<sup>6,8,9</sup>. Nevertheless, for about 10% of thin melanomas are able to develop recurrences and metastasis<sup>10,12,13,24</sup>. It is assumed that the tumor thickness might play an important role in this context<sup>6</sup>. The Breslow index is still recognized as the single most important prognostic factor for melanomas in general<sup>6,8,9</sup>. However, the presence of brisk lymphocytic infiltrate may impair the Breslow thickness as a result of difficulty to distinguish melanoma cells from melanophages<sup>14,15,16,17,18,19,20</sup>. Therefore, the aim of this study was to perform the identification of melanoma cells interspersed among the brisk lymphocytic infiltrate associated to microinvasive melanomas. For this, melanoma cells were identified using an immunohisthemical marker. The choice for Melan-A as the immunohistochemical marker was based on its advantadge for identification and characterization of the melanoma cells. Melan-A has become widely used, especially in the identification of metastatic melanoma<sup>14,25</sup>. Melan-A expression was originally thought to be lineage specific for melanocytes; however, labelling has also been found in non-melanocytic tumors, such as angiomyolipoma and in some steroid-producing cells of the adrenal cortex, ovaries and testis<sup>25,26</sup>. Its sensitivity has been reported to be better compared with that of S-100 or HMB-45<sup>14,27</sup>. Some authors have argued that Melan-A is more sensitive marker

for intra-epidermal melanocytes of normal skin than others<sup>28</sup>. Furthermore, counterstain with Azure B will impart a green color to melanin allowing the melanophages differentiation with accuracy<sup>17</sup>. In fact, our results demonstrated melanoma cells interspersed among the lymphocytic infiltrate in all cases analyzed as depicted by Melan-A immunomarker. Despite of the approach has increased the Breslow index, this one failed for improving the staging as initially recorded by hematoxilin and eosin staining in these patients.

It has been established that the presence of regression in melanomas may reflect a host response against the tumor<sup>21,29</sup>. It is conceivable that T lymphocytes and macrophages, attracted by a change in the tumor-associated antigens exert a protective role possibly through inhibitory growth factors secreted by suppressor/cytotoxic CD-8 cells<sup>1</sup>. Therefore, poorer prognosis for the thin lesions associated with regression may be explained whether the lesion was thicker originally<sup>21,29</sup>. Histologic regression was observed in 13 out of the 30 diagnosed as microinvasive melanomas in this setting. Moreover, 77% of cases preseting histological regression there were Melan-A positive cells interspersed among the lymphocytic infiltrate (10 cases). Under statistical support, data showed that melanomas with brisk lymphocytic infiltrate associated with regression has a risk for about 10% to present melanoma cells blurred by the lymphocytic infiltrate. It can be supposed that this brisk lymphocitic infiltrate could represent an early phase of histologic regression. Further

---

studies are necessary to clarify this hypothesis. Although survival was not performed in this study due to the reduced follow up, it is important to note that patients changes from stage IA to IB drop from a 10 years survival of 88% to 83% and changes from IB to IIA drop the 10 years survival from 83% to 64%<sup>3,6</sup>.

Concluding, the results of the present study show that the immunohistochemistry for Melan-A positive cells permits to correct identification of malignant cells among lymphocytic infiltrate. However, this approach did not contribute for improving the staging as initially recorded by hematoxilin and eosin staining.

### **Acknowledgements**

The authors thank Francisco C. Quevedo, Francisco Moraes Neto and Adauto J. Nunes, for providing the cases.

We are thankful to Marcos Roberto Franchi, Celene Maria Carvalho Gandin and José Carlos Pedroso Lima for technical assistance. This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant number 2003-00145-7).

## REFERENCES\*

1. Massi D, Franchi A, Borgognoni L, Reali UM, Santucci M. Thin cutaneous malignant melanoma. Identification of risk factors indicative of progression. *Cancer* 1999; 85:1067-76.
2. Wang SQ, Setlow R, Berwick M, Polsky D, Marghoob AA, Kopf AW, et al. Ultraviolet A and melanoma: a review. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44:837-46.
3. Thompson JA. The revised american joint committee on cancer staging system for melanoma. *Semin Oncol* 2002; 29:361-9.
4. Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2004; 150:179-85.
5. Schaffer JV, Rigel DS, Kopf AW, Bolognia JL. Cutaneous melanoma – past, present and future. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51:65-9.
6. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the american joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19:3635-48.

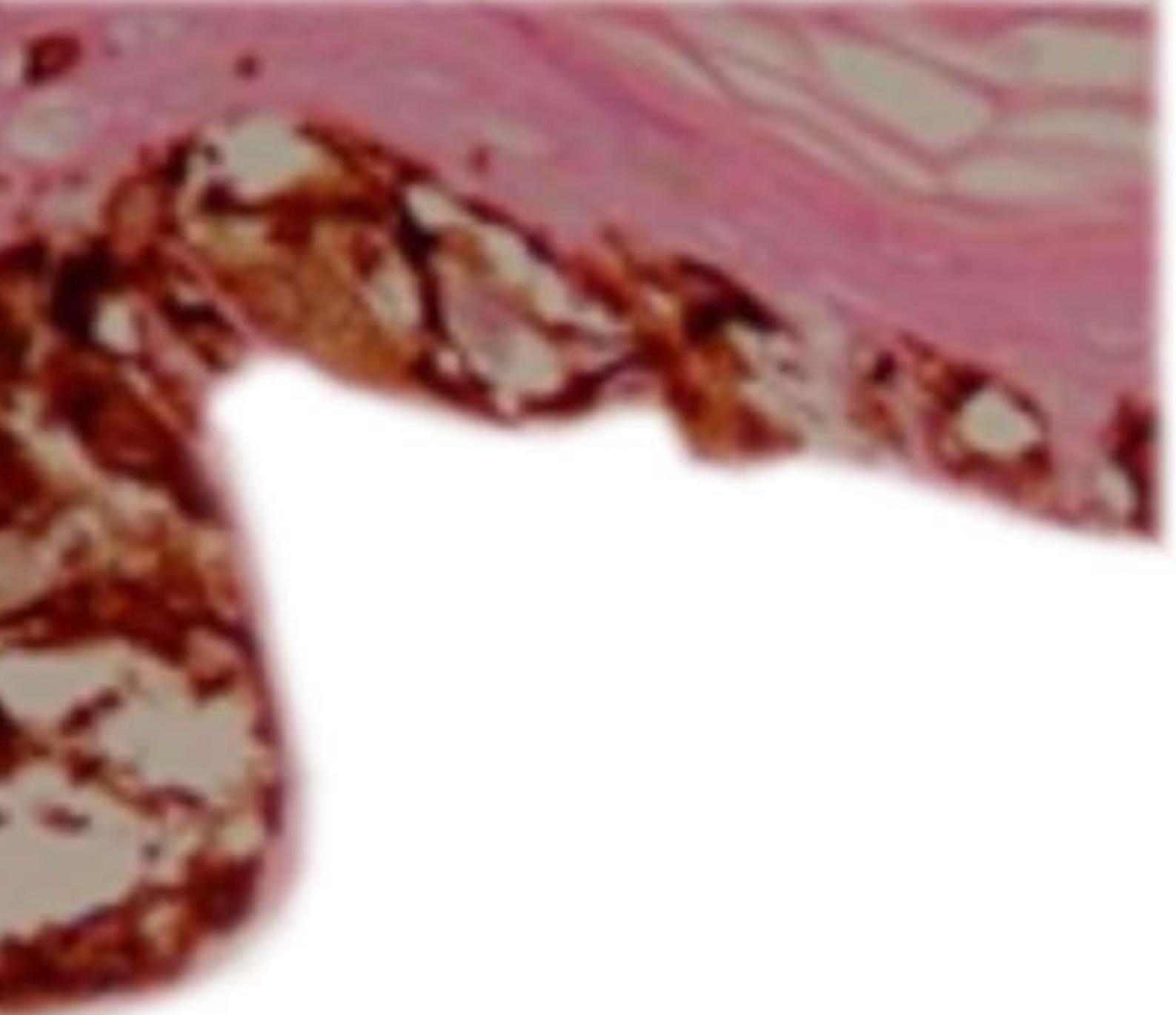
\* International Committee of Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36-47.  
National Library Of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2001. 248p.

7. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Ann Surg 1970; 172:902-8.
  8. Soong SJ, Shaw HM, Balch CM, McCarthy WH, Urist MM, Lee JY. Predicting survival and recurrence in localized melanoma: a multivariate approach. World J Surg. 1992;16;2:191-5.
  9. Masback A, Olsson H, Westerdahl J, Ingvar C, Jonsson N. Prognostic factors in invasive cutaneous malignant melanoma: a population-based study and review. Melanoma Res. 2001;11;5:435-45.
  10. Guitart J, Lowe L, Piepkorn M, Prieto VG Rabkin MS, Ronan SG, Shea CR, Tron VA, White W, Barnhill RL. Histological characteristics of metastasizing thin melanomas: a case-control study of 43 cases. Archf Dermatol 2002; 138:603-608.
  11. Taran JM, Heenan PJ. Clinical and histologic features of level 2 cutaneous malignant melanoma associated with metastasis. Cancer 2001; 91:1822-5.
  12. Kalady MF, Wuite RR, Johnson JL, Tyler DS, Seigler HF. Thin melanomas. Predictive lethal characteristics from a 30-year clinical experience. Ann Surg 2003; 238:528-37.
-

13. Lefreve M, Vergier B, Balme B, Thiebaut R, Delaunay M, Thomas L, Beyloy-Barry M, Machet L, Mureta A, Bioulac-Sagep P, Bailly C. Relevance of vertical growth pattern in thin level II cutaneous superficial spreading melanomas. Am J Surg Pathol, 2003;27;6: 717-724.
14. Smoller BR. Practical immunopathology of the skin. Totowa: Humana Press; 2002.
15. Jaffer S, Bleiweiss I. Beyond hematoxylin and eosin – the role of immunohistochemistry in surgical pathology. Cancer Invest 2004; 22:445-65.
16. Mangini J, Li N, Bhawan J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions. A review of their diagnostic usefulness. Am J Dermatopathol 2002; 24:270-81.
17. Kamino H, Tam ST. Immunoperoxidase technique modified by counterstain with azure B as a diagnostic aid in evaluating heavily pigmented melanocytic neoplasms. J Cutan Pathol 1991; 18:436-9.
18. Mehregan DR, Hamzavi I. Staining of melanocytic neoplasms by melanoma antigen recognized by T cells. Am J Dermatopathol 2000; 22:247-50.

19. Ruiter DJ, Van Dijk MCRF, Ferrier CM. Current diagnostic problems in melanoma pathology. *Semin Cutan Med Surg* 2003; 22:33-41.
20. Orchard GE, Calonje E. The effect of melanin bleaching on immunohistochemical staining in heavily pigmented melanocytic neoplasms. *Am J Surg Pathol* 1998; 20: 357-61.
21. Gromet MA, Epstein WL, Blois MS. The regressing thin malignant melanoma. *Cancer* 1978; 42:2282-92.
22. Elder D, Elenitsas R. Benign pigmented lesions and malignant melanoma. In: Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, Johnson J. Lever's histopathology of the skin. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Raven; 1997. chap.29, p.625-84.
23. Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. Malignant melanoma. In: The melanocytic proliferations: a comprehensive textbook of pigmented lesions. New York: Wiley-Liss; 2001. cap.10, p.281-397.
24. Gimotty, P.A.; Gerry, D.; Ming, M. E.; Elenitsas, R.; Xu, X.; Czerniecki, B.; Spitz, F.; Schuchter, L.; Elder, D. Thin primary cutaneous malignant melanoma: a prognostic tree for 10-year metastasis is more accurate than American joint committee on cancer staging. *Journal of Clinical Oncology*. V. 22, n.18, p.3668-3676, set 2004.

25. Jungbluth AA, Busan KJ, Gerald WL, Stockert E, Coplan KA, Iversen K, et al. A103 an anti Melan A monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. Am J Surg Pathol 1998; 22:595-602.
26. Xu X, Chu AY, Pasha TL, Elder DE, Zhang PJ. Immunoprofile of MITF, tyrosinase, Melan-A, and Mage-1 in HMB45 – negative melanomas. Am J Surg Pathol 2002; 26:82-7.
27. Clarkson KS, Sturdgess IC, Molyneux AJ. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan-A). J Clin Pathol. 2001;54;3:196-200.
28. Shabrawi-Caelen LE, Kerl H, Cerroni L. Melan-A: not a helpful marker in distinction between melanoma “in situ” on sun-damaged skin and pigmented actinic keratosis. Am J Dermatopathol. 2004;26;5:364-6.
29. Blessing K, McLaren KM. Histological regression in primary cutaneous melanoma: recognition, prevalence and significance. Histopathology 1992; 20:315-22.



*Capítulo V*

*Discussão*

---

A abordagem diagnóstica e terapêutica do melanoma vem sofrendo modificações importantes nos últimos anos. Nos anos 50 era preconizado o tratamento radical, muitas vezes com mutilações no intuito de impedir a progressão tumoral. Tal agressividade frente ao melanoma era justificada devido aos elevados índices de mortalidade por esta neoplasia, bem como a detecção de lesões em estágio avançado. Ressecções amplas de tecido subcutâneo seguindo cadeias linfáticas, desde a lesão primária até a base linfonodal referente, seguida de linfadenectomia radical bem como amputações eram padronizadas (Kanzler e Mraz-Gernbard, 2001). Durante grande parte do século XX, foi preconizada a excisão da lesão primária do melanoma com margem cirúrgica de 5 cm (Ross e Balch, 1998; Kanzler e Mraz-Gernbard, 2001). Estudos posteriores demonstraram ineficácia de ressecções amplas, sendo padronizadas margens de 0,5 cm para melanomas “in situ”, 1 cm para melanomas de 1 a 2 mm, 2 cm para lesões de 2 a 4 mm ou mais (Ross e Balch, 1998; Balch et al., 2000; Balch et al., 2001b; Tsao et al., 2004; Santos e Belfort, 2005). A linfadenectomia radical eletiva, amplamente realizada no passado, foi substituída pela linfadenectomia seletiva, feita através da pesquisa de micrometástase no linfonodo sentinel (Balch et al., 1998; Tsao et al., 2004). Assim como o tratamento do melanoma, o estadiamento utilizado nos dias atuais, passou por várias alterações desde que foi proposto inicialmente em 1947, quando a classificação era baseada na presença de metástases

---

regionais ou a distância. Os estágios variavam de 1 a 4, sendo o último o de melhor chance de sobrevida (Bakotic e Ackerman, 2005) Muitas classificações surgiram até a implantação da primeira AJCC em 1965, estadiando os tumores em TNM: sendo T=tumor primário, N=acometimento linfonodal regional e M=metástase a distância (Copeland, 1965). Este estadiamento também sofreu mudanças, baseadas nos estudos dos fatores prognósticos do melanoma, culminando com a atual AJCC 2001, seguida mundialmente. (Balch et al., 2001a). O estadiamento da neoplasia é fundamental, pois a partir dele será conduzido o tratamento.

Atualmente observa-se maior incidência de melanomas em estádios iniciais (Hal et al., 1999; Massi et al., 1999; Schaffer et al., 2004). Tal fato se deve à maior quantidade de casos diagnosticados precocemente, reflexo das campanhas de prevenção (Schaffer et al., 2004). Tem sido observado na Europa Central aumento na porcentagem de lesões finas ( $\leq 1$  mm), mudando de 39% em 1976 para 65.5% em 2000 (Leiter et al., 2004).

Devido ao aumento do diagnóstico de lesões finas, a taxa de sobrevida em 5 anos do melanoma invasivo aumentou de 50% em 1950 para 90% nos anos 90 (Schaffer et al., 2004).

Atualmente a maioria dos estudos são direcionados para as lesões precoces, buscando refinamento dos indicadores prognósticos.

---

O principal indicador prognóstico é a medida da espessura do tumor (Breslow). A partir deste dado é traçada a conduta terapêutica de cada paciente. Cabe ao médico patologista a importante tarefa de avaliar e medir precisamente o grau de invasão do melanoma (Breslow). A medida de Breslow é baseada na identificação de células malignas na profundidade da lesão (Breslow, 1970). A presença relativamente comum de infiltrado linfocitário na base dos tumores, especialmente em lesões iniciais, pode dificultar a realização desta medida. A utilização de cortes seriados ou ainda a despigmentação da lâmina são processos utilizados na tentativa de esclarecer os limites da lesão. A imunohistoquímica pode permitir a visualização de características celulares que não são vistas nas colorações de rotina e ser utilizada na fenotipagem de células melanocíticas com anticorpos específicos (Mangini e Bhawan, 2002; Smoller, 2002).

Os principais marcadores utilizados para células melanocíticas são o S-100 e o HMB-45. O S-100 é mais sensível para a caracterização melanocítica, porém pouco específico, podendo reagir também com células gliais, células de Schwan, condrócitos, lipócitos, histiócitos, entre outros. O HMB-45, cuja proteína alvo é a gp100 – localizada nos pré melanossomas, tem maior especificidade para identificar melanócitos, porém apresenta baixa sensibilidade (Smoller, 2002; Xu et al., 2002; Clarkson et al., 2001).

---

O desenvolvimento dos anticorpos anti MELAN-A/MART-1 proporcionou melhora nos índices de sensibilidade e especificidade da imunohistoquímica no melanoma. Esses anticorpos monoclonais reconhecem proteína específica de diferenciação melanocítica, expressa nos melanócitos benignos e malignos, sendo mais sensíveis e específicos que HMB-45 e S-100 (Bergman et al., 2000; Gown e Bacchi, 2002; Kelley e Starkus, 2002; Mangini e Bhawan, 2002; Lomuto et al., 2004).

Um dos fatores limitantes na utilização da imunohistoquímica é a presença de grande quantidade de pigmento de melanina nas células melanocíticas, bem como a presença de melanófagos na derme. A distinção entre a coloração marrom positiva pela imunohistoquímica e melanina se torna difícil e muitas vezes impossível devido à coloração marrom produzida pelo cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Kamino e Tam, 1991). O acúmulo de melanina, além de obscurecer a morfologia celular, pode prejudicar a imunohistoquímica, dificultando a impregnação do tecido pelo cromógeno (Orchard e Calonje, 1998).

O simples uso da contracoloração das lâminas pelo método de Giemsa, permite a fácil distinção entre célula melanocítica positiva para o marcador utilizado e melanófago. A célula melanocítica é marcada em marrom acastanhado, apresentando grânulos finos no citoplasma. A célula macrofágica com pigmento melânico no citoplasma é visualizada pela coloração em azul esverdeado, apresentando grânulos

---

citoplasmáticos grosseiros. A escolha do marcador MELAN-A foi feita após a realização de piloto, onde testou-se os seguintes marcadores: S-100, HMB-45 e MELAN-A. O MELAN-A mostrou-se mais adequado, proporcionando fácil distinção das células melanocíticas, destacando sua morfologia. A vantagem de evidenciar melhor as características morfológicas dos melanócitos corados, proporcionou aos autores maior segurança na leitura das lâminas quando comparada ao HMB-45.

A modificação técnica introduzida pela contra coloração com Giemsa, permitiu maior facilidade em precisar o envolvimento dérmico pela neoplasia.

Utilizando o método proposto, foram identificadas células de melanoma no infiltrado dérmico em 31 dos 40 casos “*in situ*” (77.5%) e em 23 dos 30 casos microinvasivos (76.6%). Este número expressivo alerta o patologista para a freqüência de células de melanoma no infiltrado dérmico associado a essa neoplasia. Portanto podemos inferir que a real espessura do tumor pode ser muitas vezes subestimada pela presença do denso infiltrado linfocitário.

Dentre os 40 casos “*in situ*”, 31 apresentaram células de melanoma na derme, caracterizando lesão nível II de Clark, exigindo, portanto, medida da espessura do tumor (Breslow). Tal fato caracteriza mudança no estadiamento e na conduta terapêutica. De acordo com a

---

AJCC, o estadiamento destes 31 casos passaria de 0 para I. De acordo com o estadiamento, o protocolo de seguimento também mudaria.

Existem vários protocolos para o seguimento do indivíduo com melanoma. De acordo com a maioria deles, o paciente com melanoma “in situ” deve ser tratado com ampliação de margens de 0,5 cm e seguimento clínico laboratorial anual. O paciente com melanoma de espessura menor ou igual a 1 mm (T1) deve ser submetido a ampliação de margens com 1 cm e seu seguimento clínico laboratorial pode variar de 1 a 4 visitas por ano, sendo indicada a pesquisa do linfonodo sentinel para tumores a partir de 1mm de espessura (Jost, 2003; Tsao et al., 2004; Francken et al., 2005; National Cancer Institute, 2005). De acordo com o Grupo Brasileiro de Melanoma (GBM), segue-se o mesmo protocolo apenas com divergência quanto à indicação da pesquisa do linfonodo sentinel. Para o GBM, nos casos de tumores com espessura maior ou igual a 0.76mm, além da ampliação de margens de 1cm é sugerida a pesquisa do linfonodo sentinel. A pesquisa de linfonodo sentinel é também indicada pelo GBM para tumores menores que 0.76 mm de espessura acompanhados de regressão histológica (Neves et al., 2004; Rousseau e Jeffrey, 2004; Starz, 2004; Belfort e Sanches, 2005).

No presente estudo, a conduta terapêutica e o seguimento seriam diferentes para 31 dos 40 pacientes anteriormente classificados como melanoma “in situ”, independente do protocolo

---

utilizado. Nestes 31 casos, a ampliação de margens deveria ser feita com 1 cm e o seguimento passaria a ser trimestral.

No estudo desenvolvido, o alvo inicial foram os melanomas “in situ” com denso infiltrado (40 casos), sendo posteriormente ampliado com estudo dos melanomas microinvasivos (30 casos), também com denso infiltrado linfocitário. Foram estudados vários aspectos relevantes ao direcionamento terapêutico e prognóstico, bem como características epidemiológicas e histológicas da amostra.

Quanto à localização, observou-se predomínio distinto de acordo com o sexo. A maior prevalência de lesões no tronco para o sexo masculino e lesões nos membros inferiores para o feminino é descrito na literatura podendo ser explicado pelos hábitos sociais diferentes entre os sexos (Johnson et al., 1998 ; Langley et al., 1998; Hal et al., 1999).

O subtípico histológico mais freqüente foi o extensivo superficial, concordando com os dados da literatura (Crowson et al., 2001; Johnson et al., 1998).

O estudo dos melanomas microinvasivos permitiu análise da presença de regressão histológica, a qual foi observada em 10 dos 23 casos microinvasivos estudados com células de melanoma (Melan-A positivas) na derme e em 3 casos dos 7 com células negativas. Através da análise estatística chega-se à conclusão de que, ao observar-se o fenômeno da regressão parcial no melanoma com denso infiltrado

---

linfocitário, tem-se um risco de 10% de haver célula do melanoma na derme obscurecida pelo infiltrado. Sabe-se que a regressão reflete a destruição imunológica do tumor pelo hospedeiro e que a ocorrência de metástase pode ser justificada pelo fato do tumor ter sido mais espesso antes de sofrer regressão (Blessing e McLaren, 1972; Gromet et al., 1998). Considerando a hipótese de que um denso infiltrado linfocitário possa representar um estágio inicial de regressão, o achado de células de melanoma em meio ao infiltrado linfocitário é esperado como fazendo parte do fenômeno da regressão em determinados casos.

Embora a análise da sobrevida seja limitada neste estudo devido ao pouco tempo de seguimento, é importante salientar que, ao mudarem de estadiamento, passando de 0 para IA, os pacientes passam de uma sobrevida de 100% para 88% em 10 anos (Balch et al., 2001a; Thompson, 2002) e passam a apresentar um risco de recorrência de 4 a 24% (Moloney et al., 1996; Kalady et al., 2003; Francken et al., 2005).

Esta mudança na condução clínico-terapêutica é de suma importância, pois, ao classificar corretamente um caso de melanoma no seu devido estádio clínico, estar-se-á propondo melhor tratamento clínico e seguimento, com chances reais de recidiva e sobrevida.

---

## REFERÊNCIAS\*

Bakotic B, Ackerman BA. Staging of melanoma: a critique in historical perspective. Am J Dermatopathol, 2005; 27:160-4.

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the american joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. J Clin Oncol 2001a; 19:3635-48.

Balch CM, Cascinelli N, Sim FH, Soong SJ, Bufalino R. Elective lymph node dissection: results of prospective randomized surgical surgical trials. In: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ. Cutaneous melanoma. 3<sup>rd</sup> ed. St. Louis: Quality Medical Publishing; 1998. chap.14, p.209-26.

Balch CM, Soong S, Smith T, Ross MI, Urist MM, Karakousis CP, et al. Long-term results of a prospective surgical trial comparing 2 cm vs. 4 cm excision margins for 740 patients with 1-4 mm melanomas. Ann Surg Oncol 2001b; 8: 101-8.

Balch CM, Soong S, Ross MI, Urist MM, Karakousis CP, Temple WJ, et al. Long-term results of a multi-institutional randomized trial comparing prognostic factors and surgical results for intermediately thickness melanomas (1.0 to 4.4 mm). Ann Surg Oncol 2000; 7:87-97.

---

\* Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas biomédicas. J Pediatr 1997; 73: 213-24.  
National Library Of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2001. 248p.

---

Belfort FA, Sanches Jr JA. Seguimentos. São Paulo: GBM; 2005 [acesso 09 Nov 2005]. Disponível em: [http://www.gbm.org.br/ac\\_livre/apoio/art011.asp](http://www.gbm.org.br/ac_livre/apoio/art011.asp).

Bergman R, Azzan H, Sprecher E, Manov L, Munichor M, Friedman-Birnbaum, et al. A comparative immunohistochemical study of MART-1 expression in spitz nevi, ordinary melanocytic nevi and malignant melanoma. J Am Acad Dermatol 2000; 42:496-500.

Blessing K, McLaren KM. Histological regression in primary cutaneous melanoma: recognition, prevalence and significance. Histopathology 1992; 20:315-22.

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Ann Surg 1970; 172:902-8.

Clarkson KS, Sturdgess IC, Molyneux AJ. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan-A). J Clin Pathol. 2001;54;3:196-200.

Copeland, MM. American joint committee on cancer staging and end results reporting. Cancer 1965; 18:1637-40.

---

Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. Malignant melanoma. In: The melanocytic proliferations: a comprehensive textbook of pigmented lesions. New York: Wiley-Liss; 2001. cap.10, p.281-397.

Francken AB, Bastiaannet E, Hoeksta HJ. Follow-up in patients with localized primary cutaneous melanoma. *Lancet Oncol* 2005; 6:608-21.

Gown AM, Bacchi CE. Diagnostic immunohistochemistry. In: Proceedings of the Meeting United States – Canadian Academy Of Pathology; 2002; Chicago. Chicago; 2002. 63p.

Gromet MA, Epstein WL, Blois MS. The regressing thin malignant melanoma. *Cancer* 1978; 42:2282-92.

Hall HI, Miller DR, Rogers JD, Bewerse B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40:35-42.

Johnson TM, Dolan OM, Hamilton TA, Lu MC, Swanson NA, Lowe L. Clinical and histologic trends of melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38:681-6.

Jost LM. ESMO minimum clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow up of cutaneous malignant melanoma. *Ann Oncol* 2003; 14:1012-3.

---

Kalady MF, Wuite RR, Johnson JL, Tyler DS, Seigler HF. Thin melanomas. Predictive lethal characteristics from a 30-year clinical experience. Ann Surg 2003; 238:528-37.

Kamino H, Tam ST. Immunoperoxidase technique modified by counterstain with azure B as a diagnostic aid in evaluating heavily pigmented melanocytic neoplasms. J Cutan Pathol 1991; 18:436-9.

Kanzler MH, Mraz-Gernbard S. Primary cutaneous malignant melanoma and its precursor lesions: diagnostic and therapeutic overview. J Am Acad Dermatol 2001; 45:260-76.

Kelley LC, Starkus L. Immunohistochemical staining of lentigo maligna during mohs micrographic surgery using MART-1. J Am Acad Dermatol 2002; 46:78-84.

Langley RGB, Barnhill RL, Mihm MC, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Neoplasms: Cutaneous melanoma. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolf K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, et al. Dermatology in general medicine. 5<sup>th</sup> ed. New York: Macgraw Hill; 1999. cap.92, p.1080-116.

Leiter U, Buettner PG, Eigentler TK, Garbe C. Prognostic factors of thin cutaneous melanoma: an analysis of the central malignant melanoma registry of the german dermatological society. J Clin Oncol 2004; 22:3660-7.

---

Lomuto M, Calabrese A, Giuliani A. Prognostic signs in melanoma: state of the art. Eur Acad Dermatol Venereol 2004; 18:291-300.

Mangini J, Li N, Bhawan J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions. A review of their diagnostic usefulness. Am J Dermatopathol 2002; 24:270-81.

Massi D, Franchi A, Borgognoni L, Reali UM, Santucci M. Thin cutaneous malignant melanoma. Identification of risk factors indicative of progression. Cancer 1999; 85:1067-76.

Moloney DM, Gordon DJ, Briggs JC, Rigby HS. Recurrence of thin melanoma: how effective is follow-up? Br J Plast Surg 1996; 49:409-13.

National Cancer Institute. Treatment option overview [cited 2005 out 20]. Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma>.

Neves RI, Belfort F, Brandão M, Castanheira D, Jorge D, Parro F, et al. Relatório final do consenso nacional sobre linfonodo sentinel. Bol Inform GBM 2004; 6:1-2.

Orchard GE, Calonje E. The effect of melanin bleaching on immunohistochemical staining in heavily pigmented melanocytic neoplasms. Am J Surg Pathol 1998; 20: 357-61.

---

Ross MI, Balch CM. Surgical treatment of primary melanoma. In: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S-J. Cutaneous melanoma. 3<sup>rd</sup> ed. St. Louis: Quality Medical Publishing; 1998. Chap.8, p.141-53.

Rousseau DL, Gershenwald, JE. The new staging system for cutaneous melanoma in the era of lymphatic mapping. *Semin Oncol* 2004; 31:415-25.

Santos IPAQ, Belfort FA. Tratamento do melanoma cutâneo. São Paulo: GBM; 2005. [acesso 09 nov 2005]. Disponível em:[http://www.gbm.org.br/ac\\_livre/apoio/art011.asp..](http://www.gbm.org.br/ac_livre/apoio/art011.asp..)

Schaffer JV, Rigel DS, Kopf AW, Bologna JL. Cutaneous melanoma – past, present and future. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51:65-9.

Smoller BR. Practical immunopathology of the skin. Totowa: Humana Press; 2002.

Starz H. Pathology of the sentinel lymph node in melanoma. *Semin Oncol* 2004; 31:357-62.

Thompson JA. The revised american joint committee on cancer staging system for melanoma. *Semin Oncol* 2002; 29:361-9.

---

Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. N Engl J Med 2004; 351:998-1012.

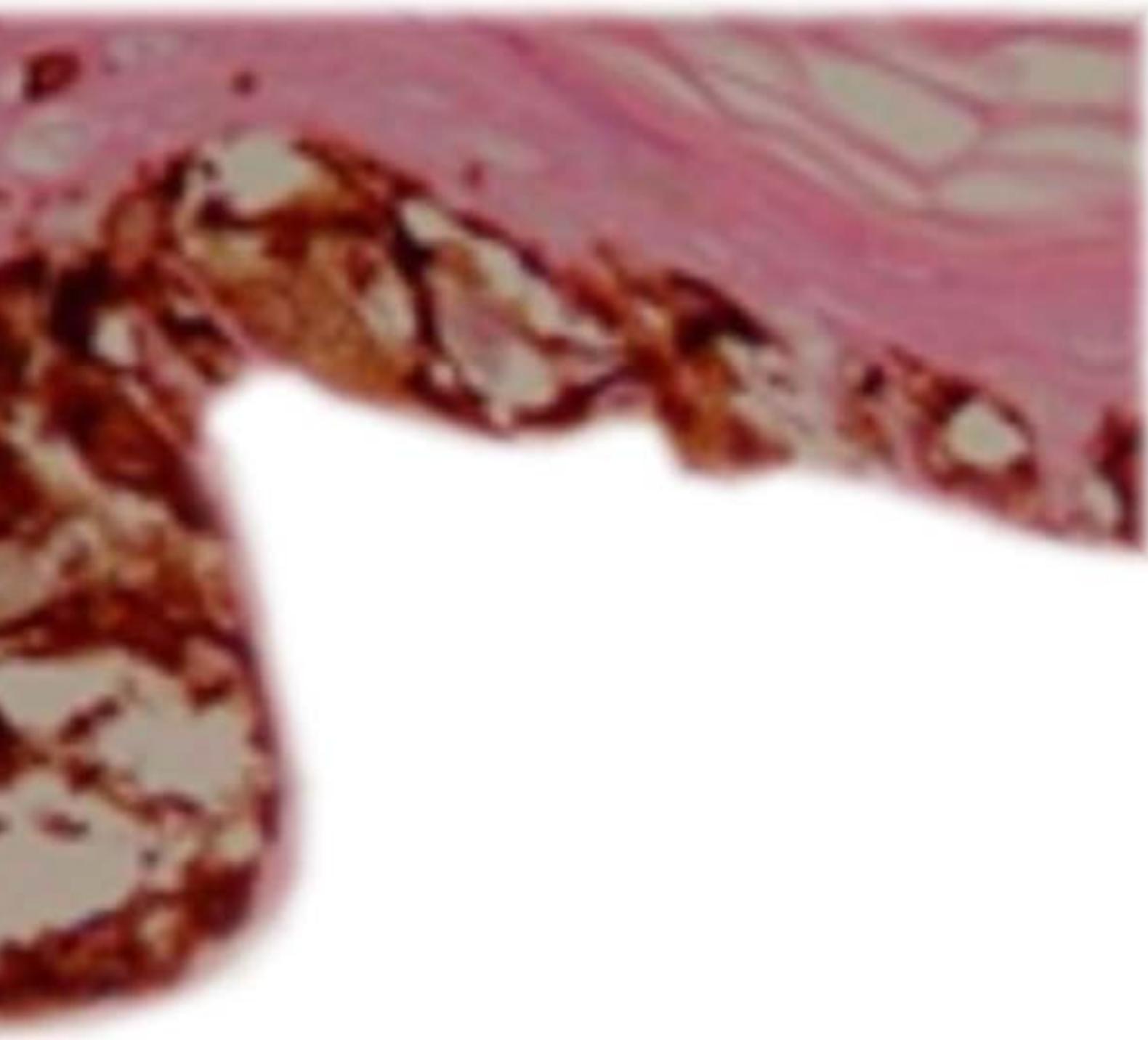
Xu X, Chu AY, Pasha TL, Elder DE, Zhang PJ. Immunoprofile of MITF, tyrosinase, Melan-A, and Mage-1 in HMB45 – negative melanomas. Am J Surg Pathol 2002; 26:82-7.

---

## **Capítulo VI- CONCLUSÃO**

Os resultados do presente estudo permitem concluir que a pesquisa de células de melanoma utilizando a técnica imunohistoquímica descrita é de grande valia nos casos de melanoma “*in situ*” com denso infiltrado inflamatório obscurecendo os limites da lesão. Tal pesquisa impede que o Breslow seja subestimado. O presente estudo mostrou que 31 dos 40 melanomas “*in situ*” fazem parte na realidade dos melanomas microinvasivos, isto é, passíveis de terem sua espessura medida e tratados como tal. O presente estudo deixa sua contribuição por proporcionar ao patologista melhor acurácia e ao paciente a melhor conduta.

---

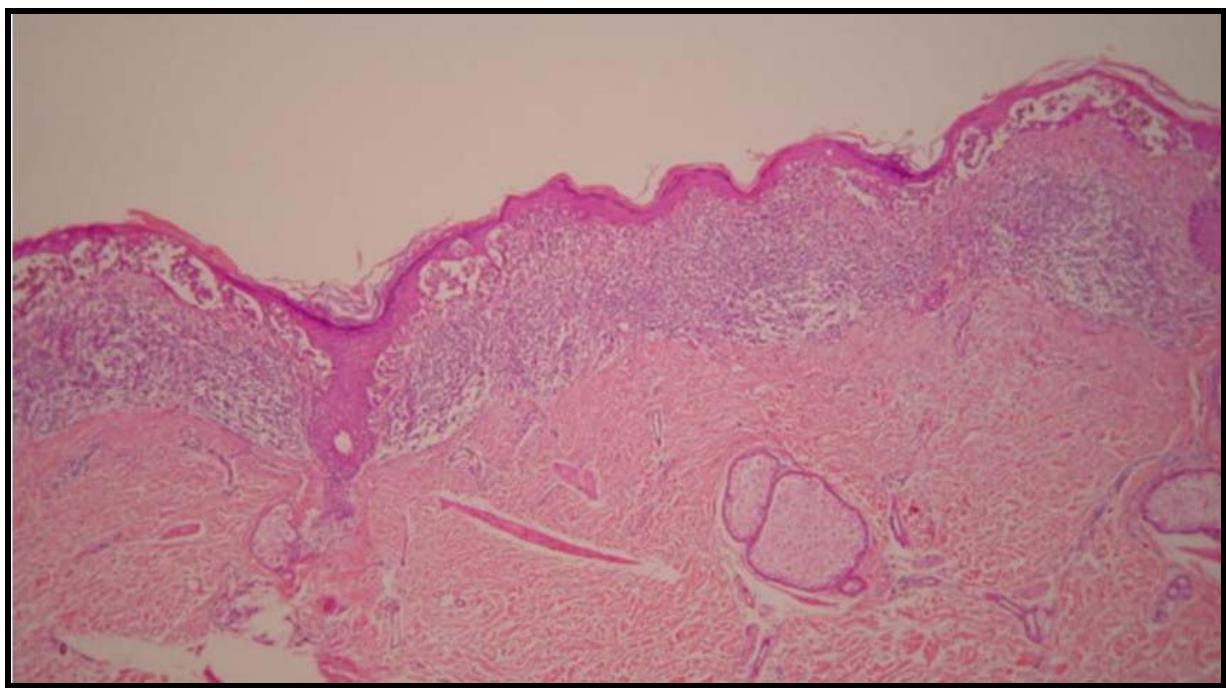


## *Capítulo VIII*

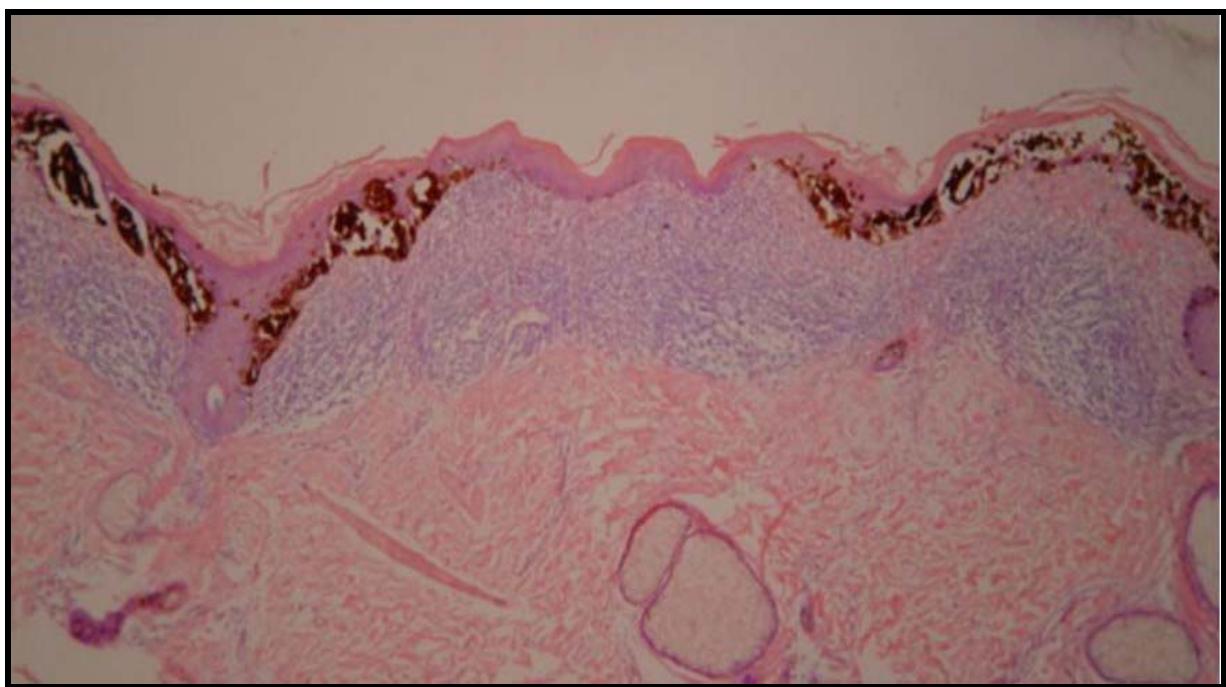
*Apêndice*

---

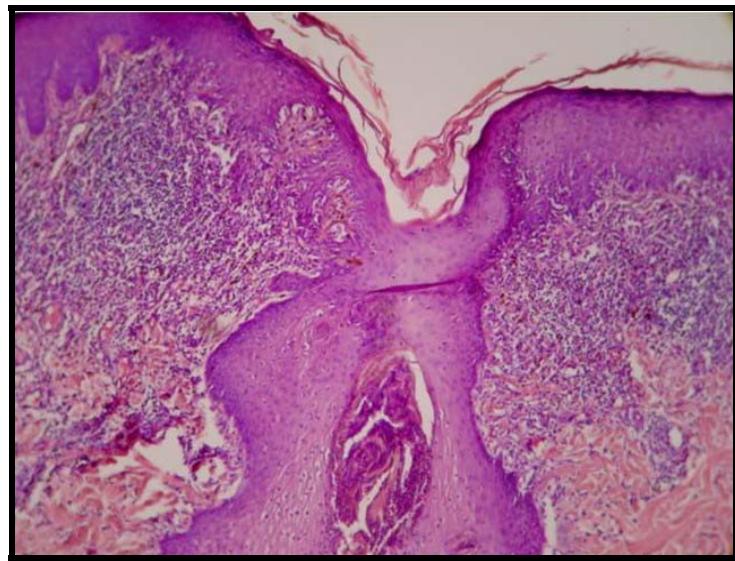
**MELANOMAS “IN SITU”**



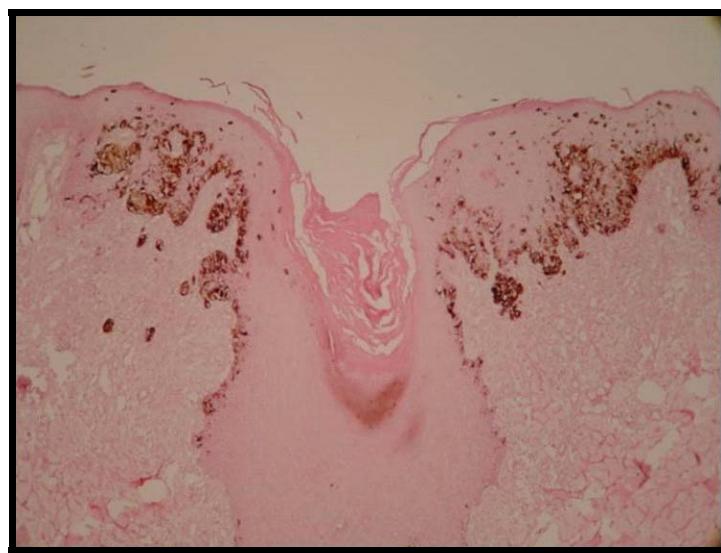
**Figura 1** – Melanoma “in situ” com infiltrado linfocitário ativo obscurecendo os limites inferiores da lesão (HE 50x), caso 23.



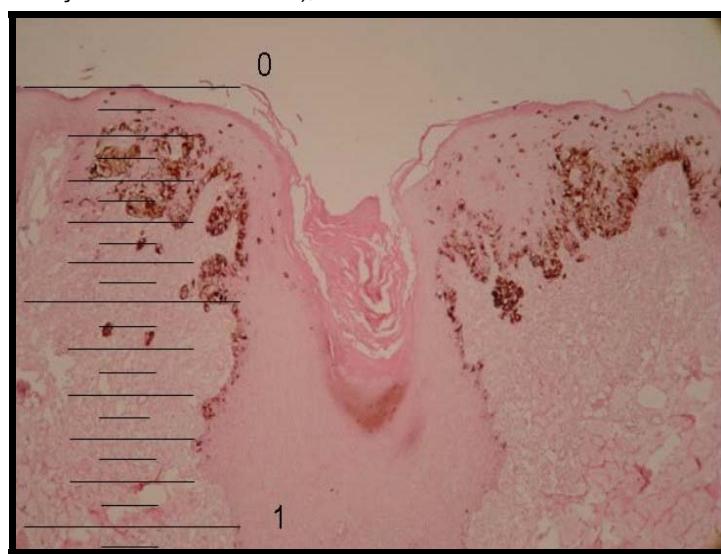
**Figura 2** – Melanoma “in situ”: ausência de células MELAN-A positivas no infiltrado linfocitário (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 50x), caso 23.



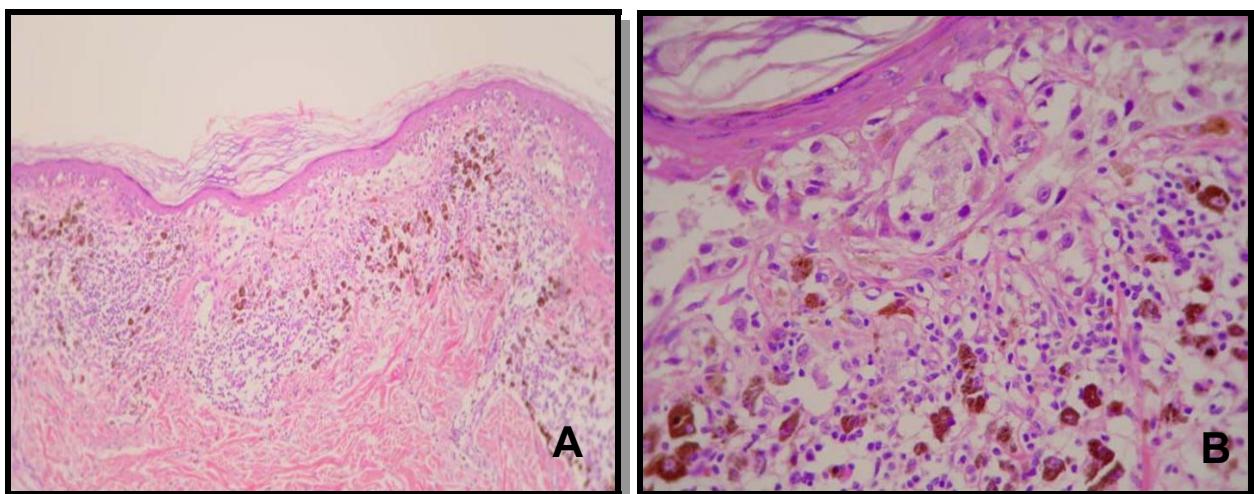
**Figura 3** – Melanoma “in situ” com infiltrado linfocitário ativo (HE 100x), caso 19.



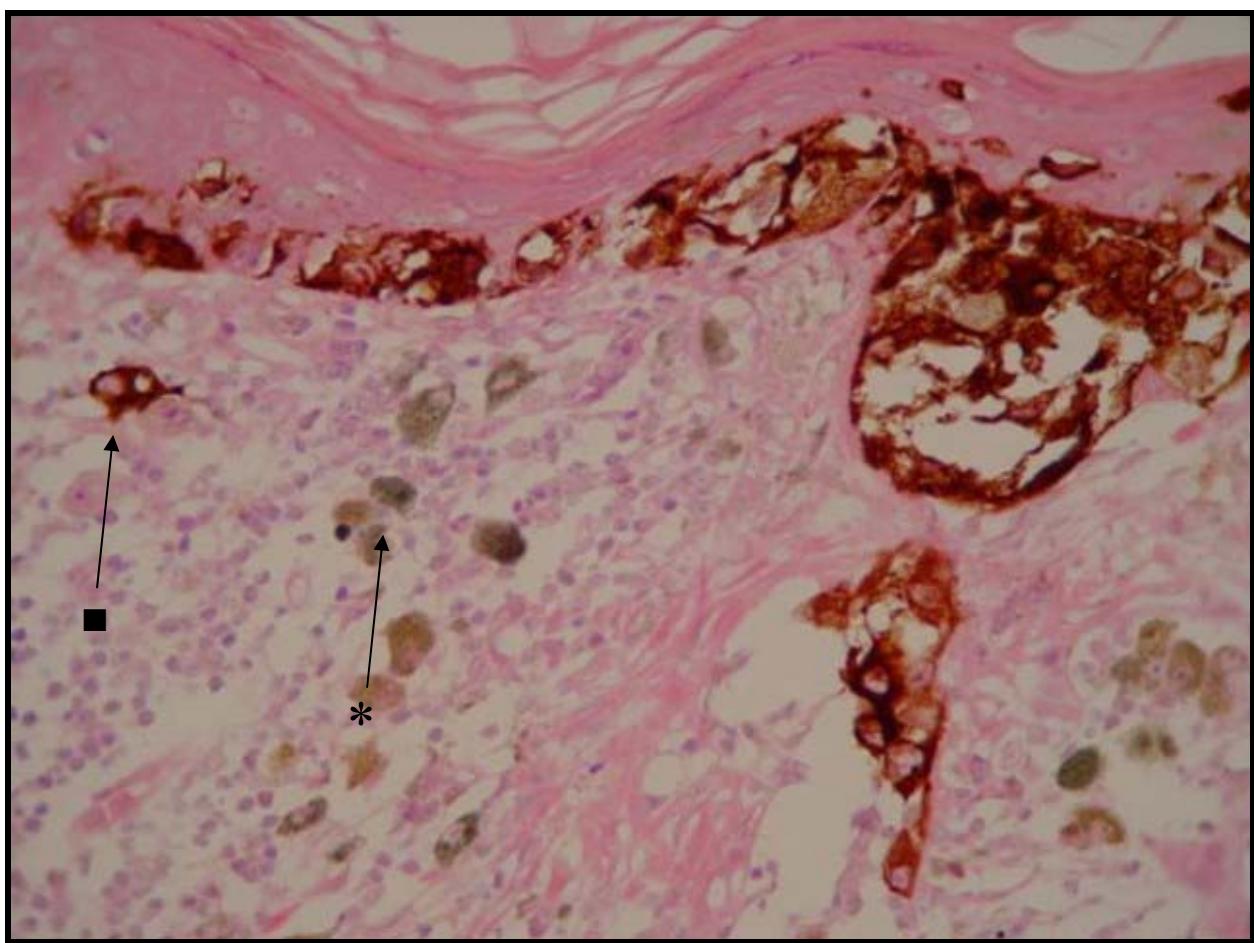
**Figura 4** – Melanócitos corados pelo MELAN-A no infiltrado (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 100x), caso 19.



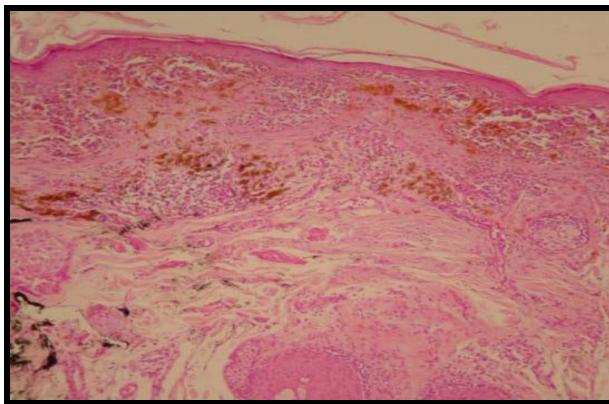
**Figura 5** – Medida da espessura após imunohistoquímica - 0.6mm (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 100x), caso 19.



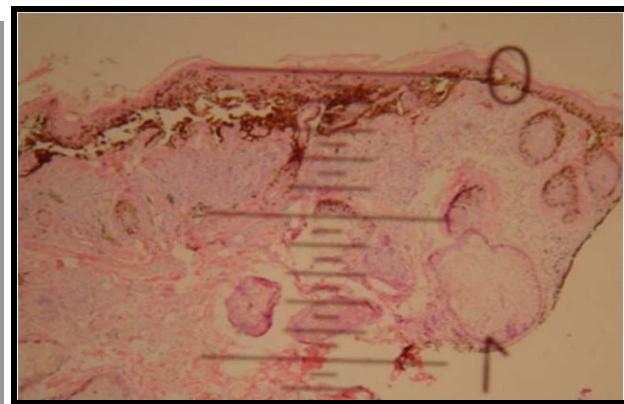
**Figura 6 A e B** – Melanoma “in situ” com infiltrado linfocitário ativo e melanófagos (HE 100x; HE 400x), caso 30.



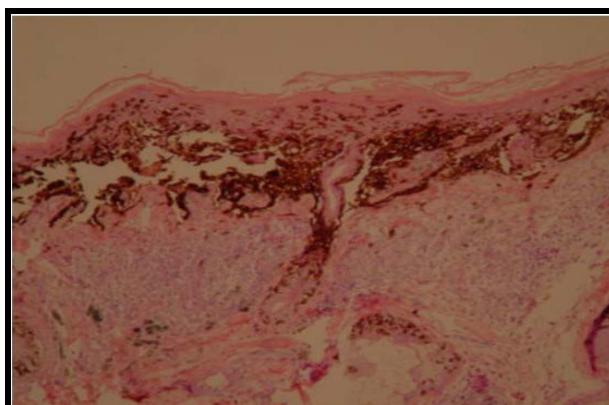
**Figura 7** – Diferenciação entre melanócitos e macrófagos. Melanócitos corados em marrom pelo MELAN-A (■) e melanófagos corados em azul esverdeado (\*). (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 400x), caso 30.



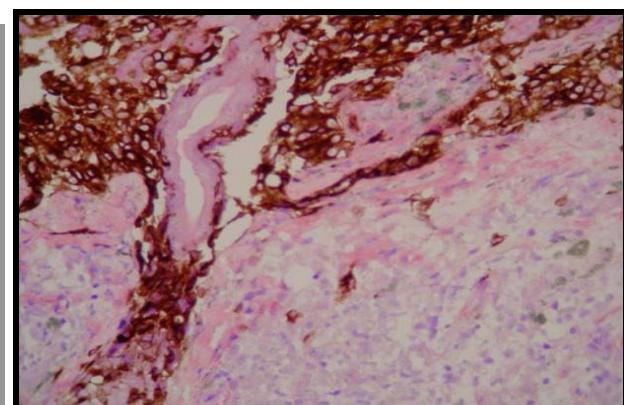
**Figura 8** – Melanoma “in situ” com infiltrado linfocitário ativo e melanófagos (HE 100x), caso 24.



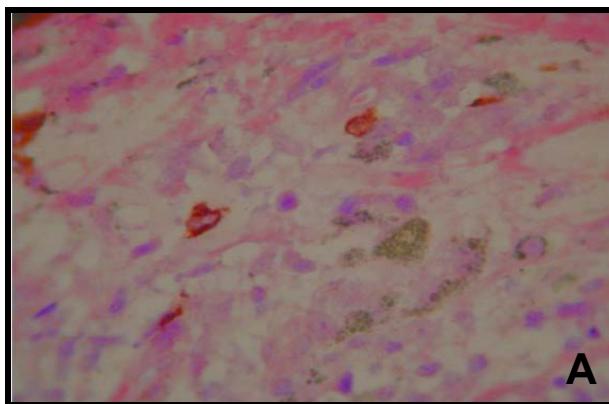
**Figura 9** – Medida da espessura após a imuno-histoquímica – 0.3mm. (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 50x), caso 24.



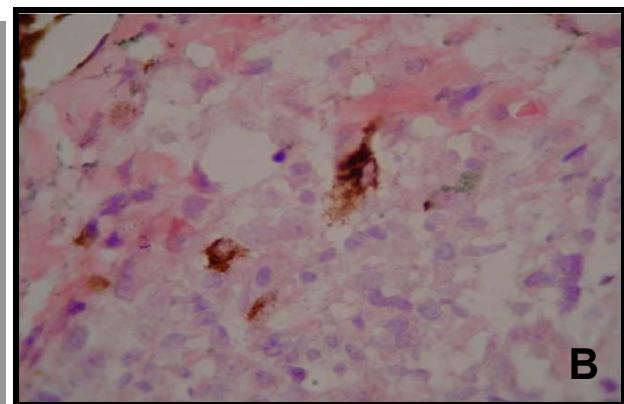
**Figura 10** – Melanócitos e melanófagos distintamente corados. Melanócitos corados em marrom pelo MELAN-A e melanófagos em azul esverdeado (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 50x), caso 24.

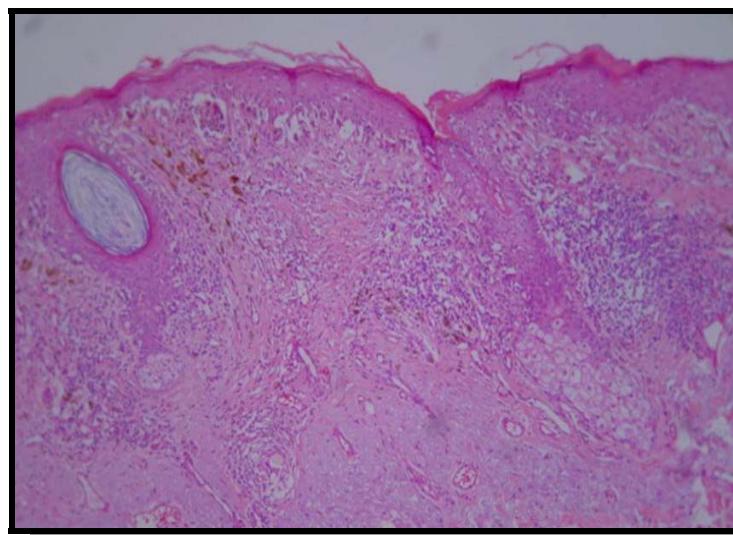


**Figura 11** – Detalhe da figura 10: Melanócitos e melanófagos distintamente corados. Melanócitos corados em marrom pelo MELAN-A e melanófagos em azul esverdeado (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 400x), caso 24.

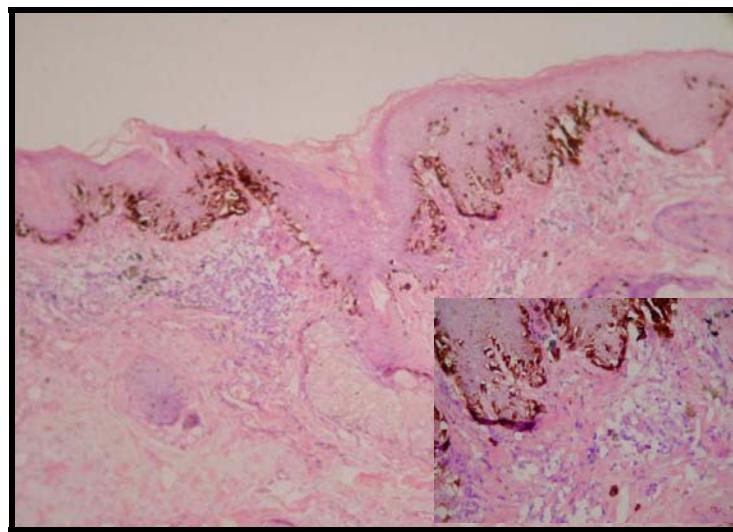


**Figura 12 A e B** – Detalhe da figura 10: Melanócitos com grânulos citoplasmáticos finos corados em marrom pelo MELAN-A. Melanófagos com grânulos azul esverdeados grosseiros (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 1000x), caso 24





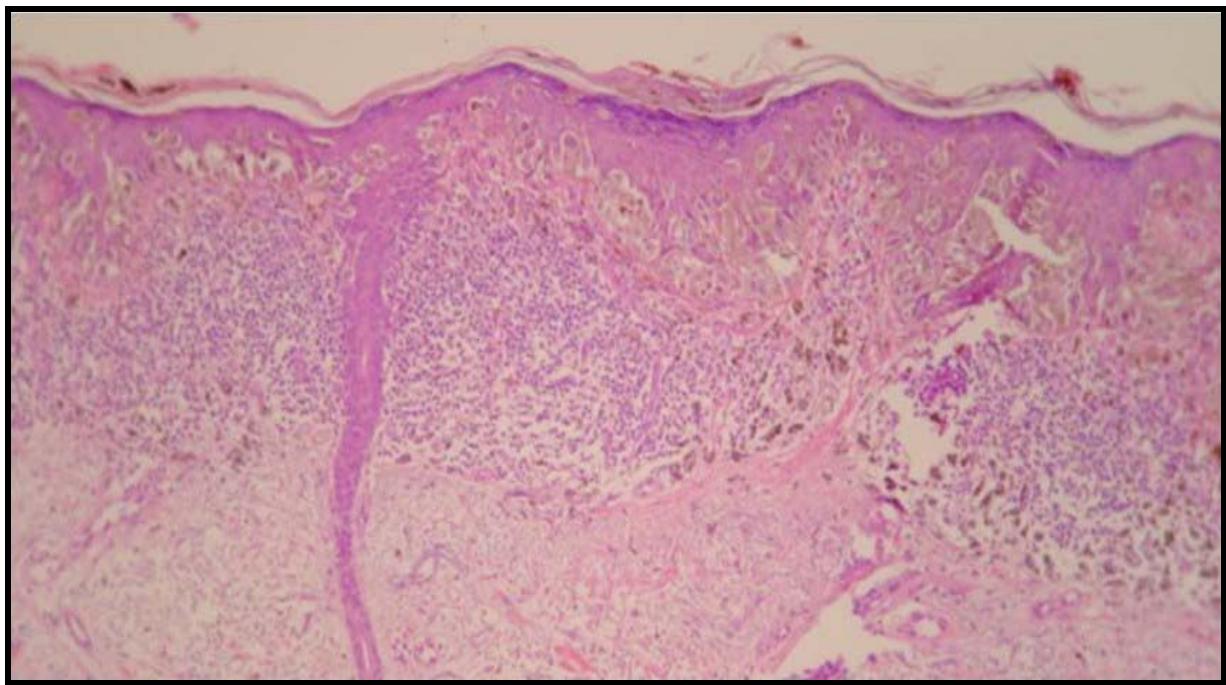
**Figura 13** – Melanoma “in situ” com infiltrado linfocitário ativo e melanófagos (HE 100x), caso 26.



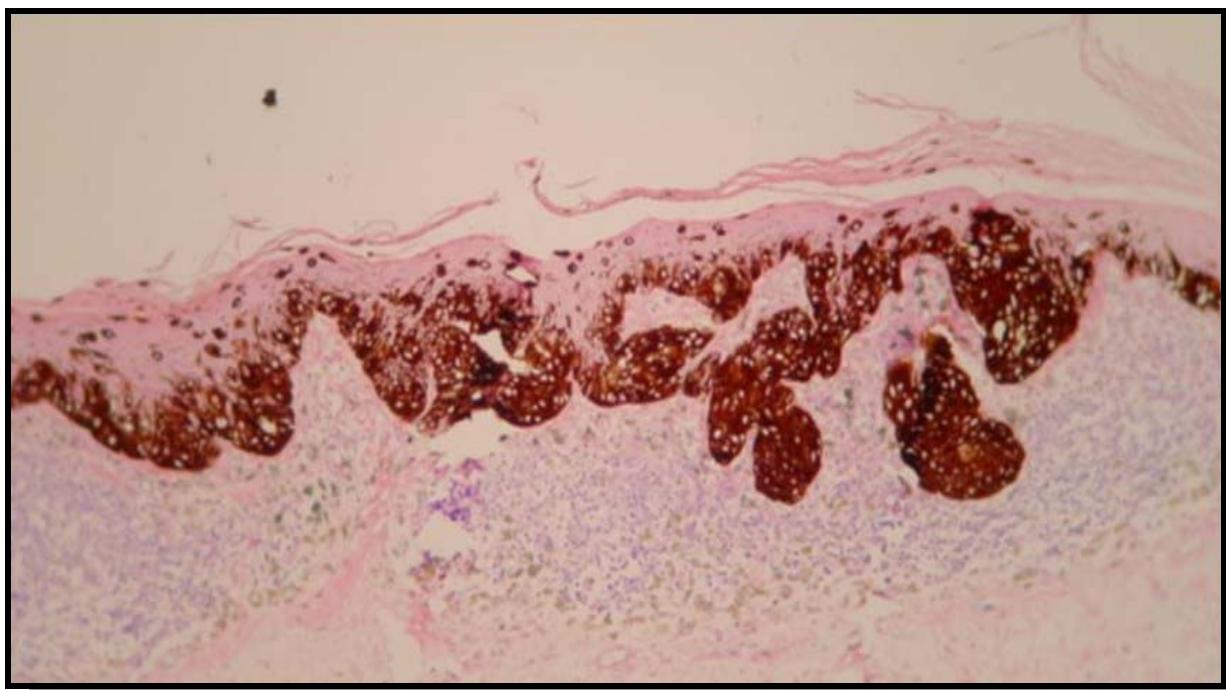
**Figura 14** – Presença de células de melanoma, coradas em marrom pelo MELAN-A, e melanófagos, corados em azul-esverdeado, no infiltrado linfocitário (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 100x). Detalhe no canto inferior direito (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 400x), caso 26.



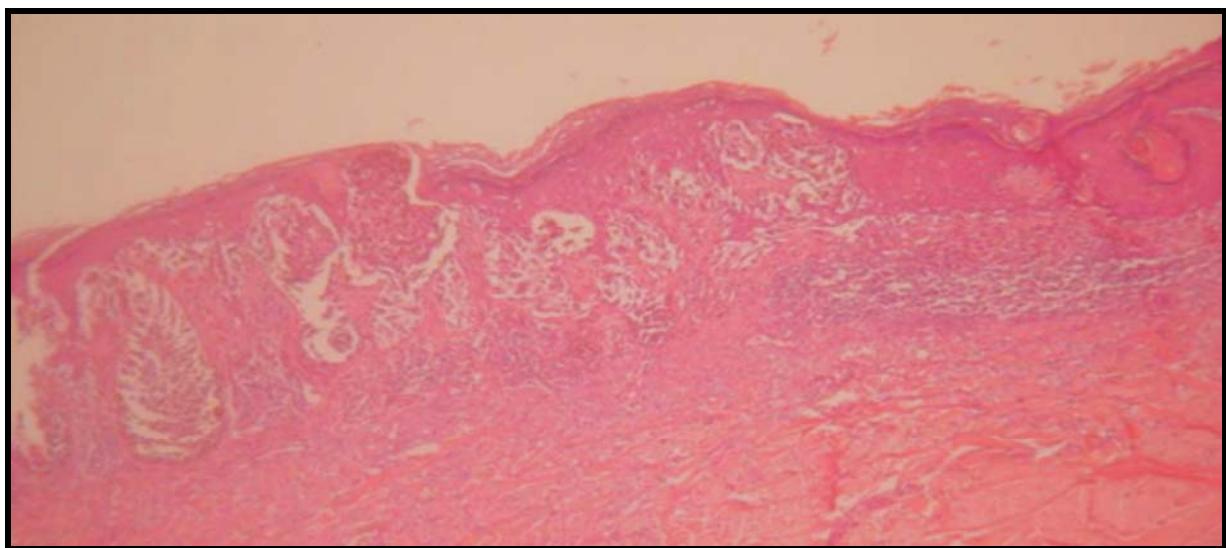
**Figura 15** – Medida da espessura da lesão após imunohistoquímica - 0.38mm (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 50x), caso 26.



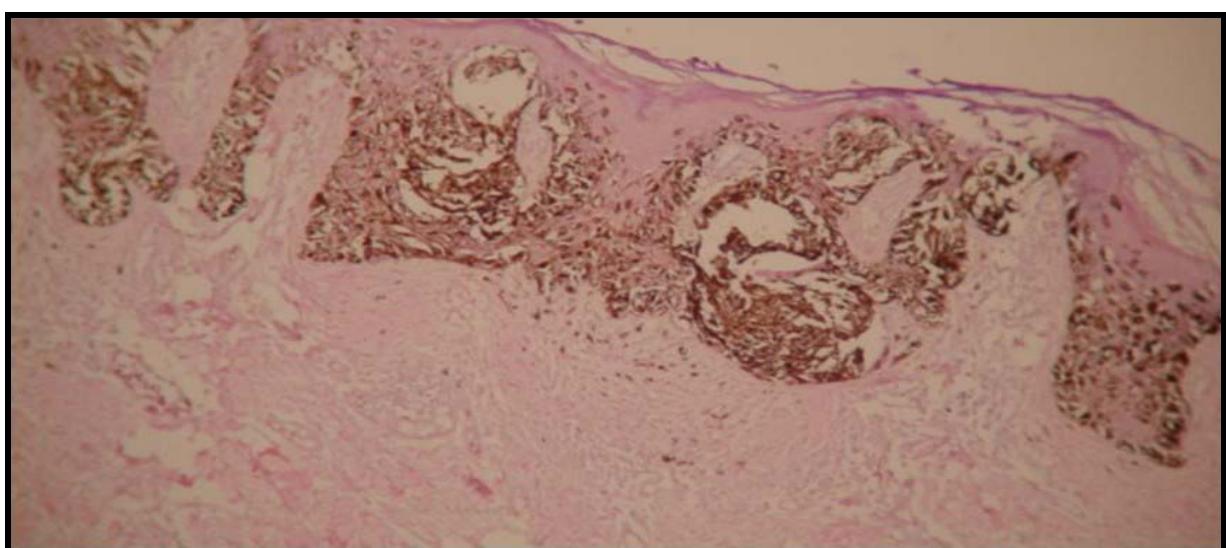
**Figura 16** – Melanoma “in situ” com infiltrado linfocitário ativo na base da lesão. Presença de melanófagos (HE 100x), caso 28.



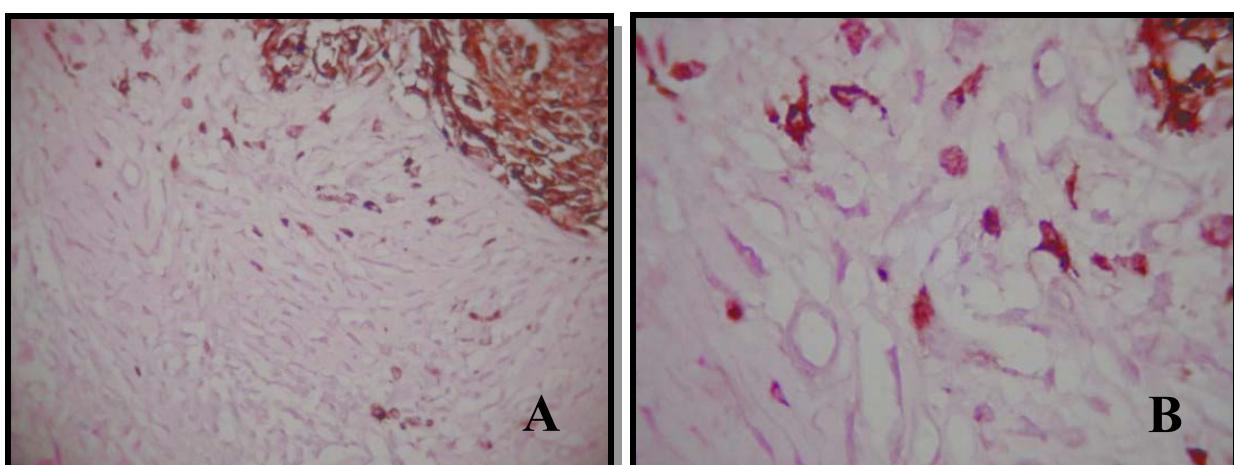
**Figura 17** – Melanoma “in situ”: ausência de células MELAN-A positivas no infiltrado linfocitário. Presença de melanófagos, corados em azul-esverdeado na base da lesão (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 100x), caso 28.



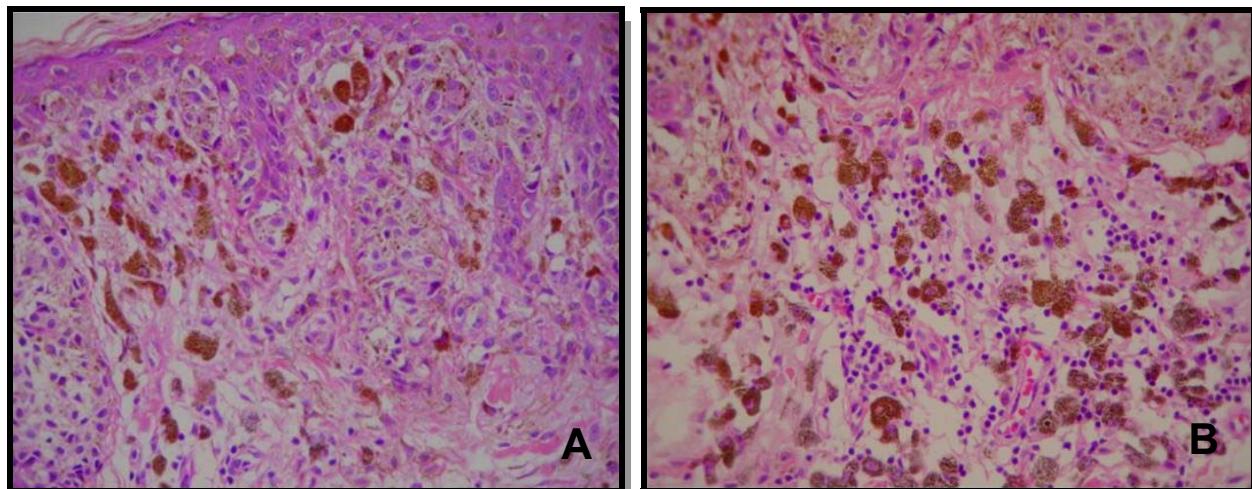
**Figura 18** – Melanoma “in situ” com infiltrado linfocitário ativo (HE 100x), caso 5.



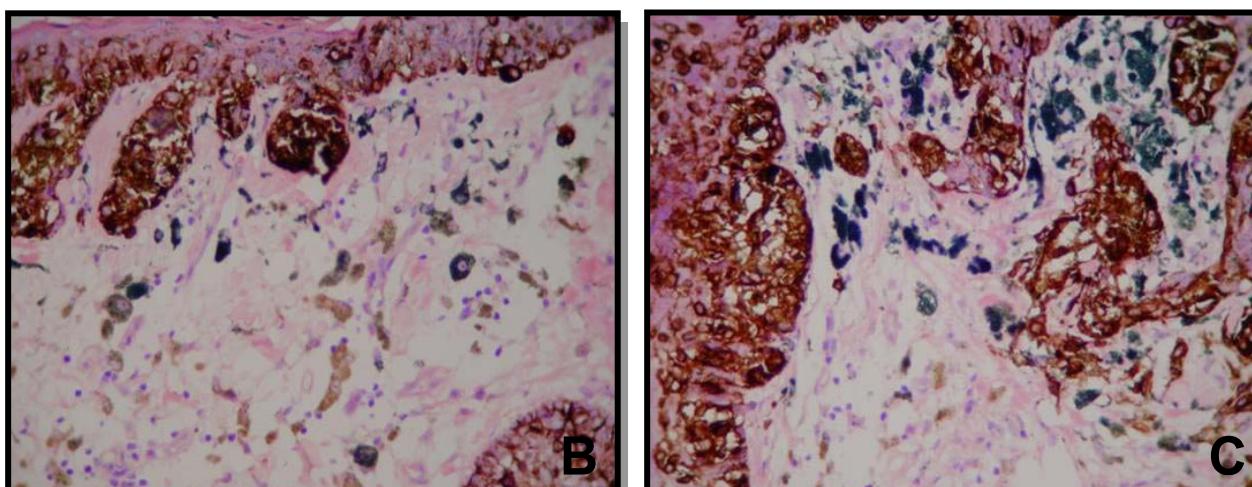
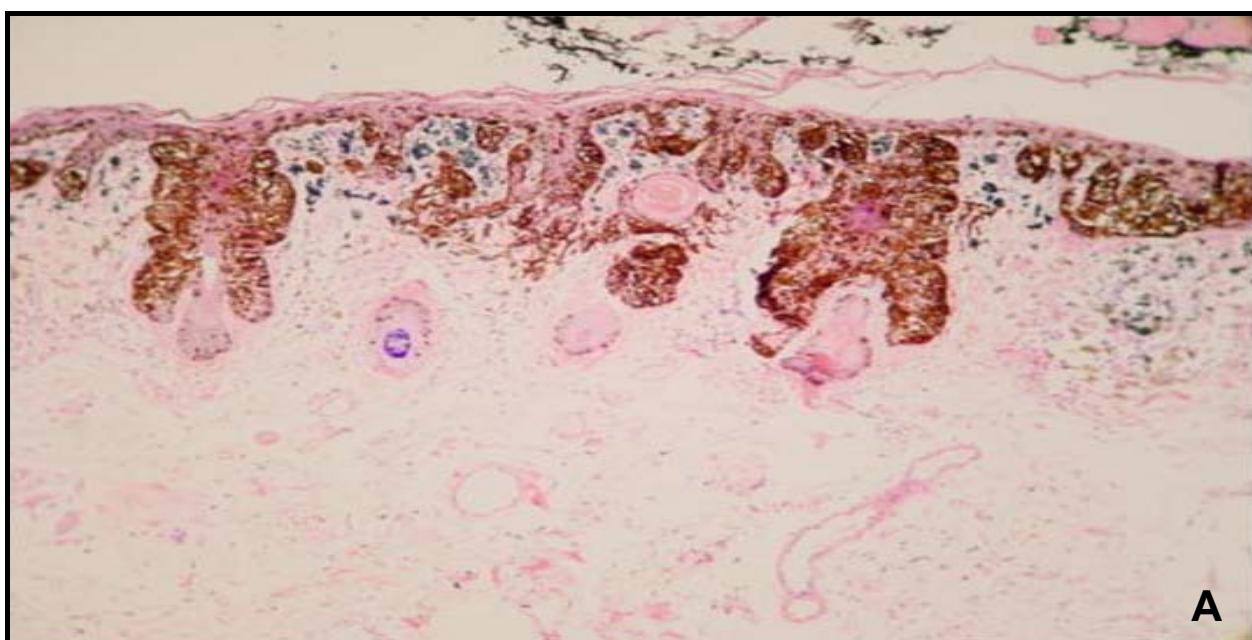
**Figura 19** – Identificação de melanócitos MELAN –A positivos no infiltrado linfocitário ativo (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 100x), caso 5.



**Figura 20 A e B** – Melanócitos MELAN-A positivos no infiltrado linfocitário ativo (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 400x , 1000x), caso 5.

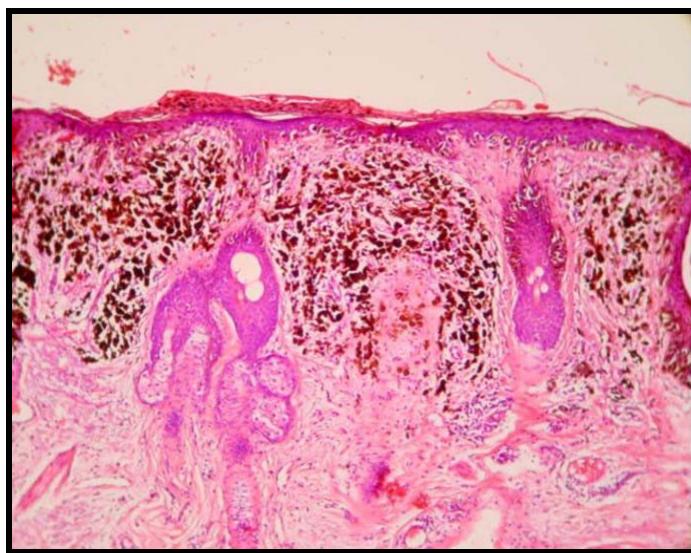


**Figura 21 A e B** – Melanoma “in situ” com grande quantidade de melanina e linfócitos na derme (HE 400x), caso 14.

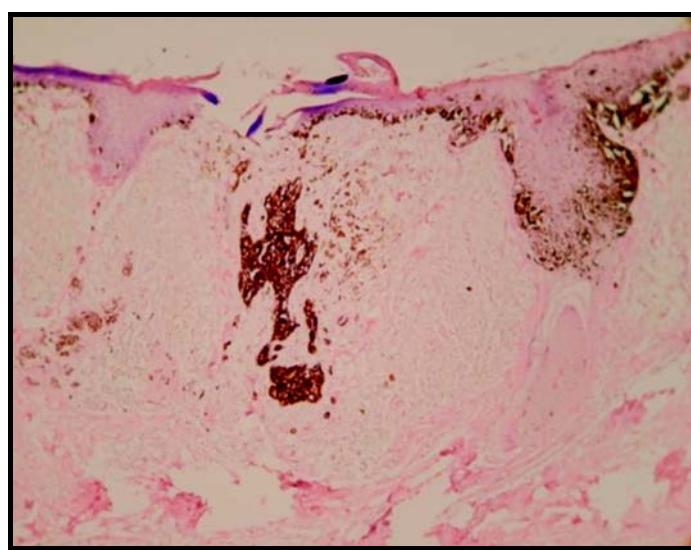


**Figura 22 A, B e C** – Melanócitos MELAN-A positivos (corados em marrom) e melanófagos (corados em azul esverdeado) no infiltrado linfocitário ativo (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 100x; 200x e 400x), caso 14.

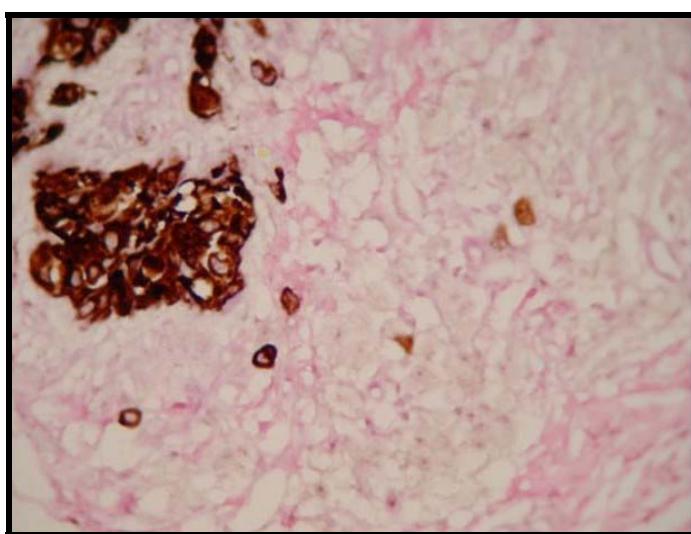
**MELANOMAS MICROINVASIVOS**



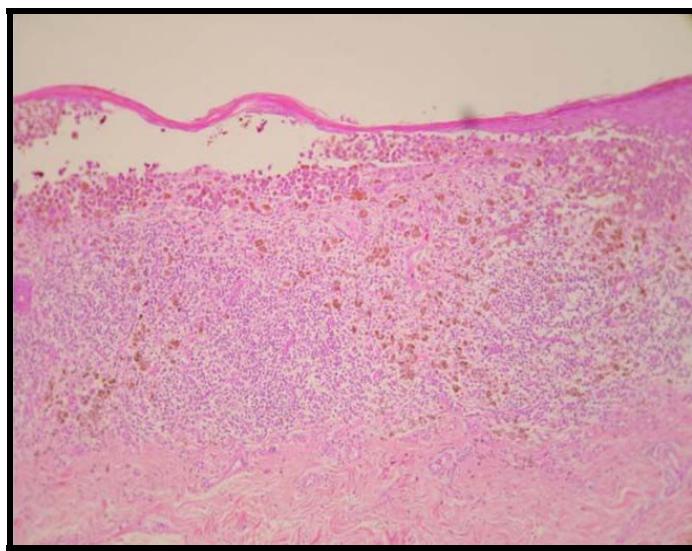
**Figura 1** – Melanoma com 0.15mm de Breslow intensamente pigmentado (HE 100x), caso 14.



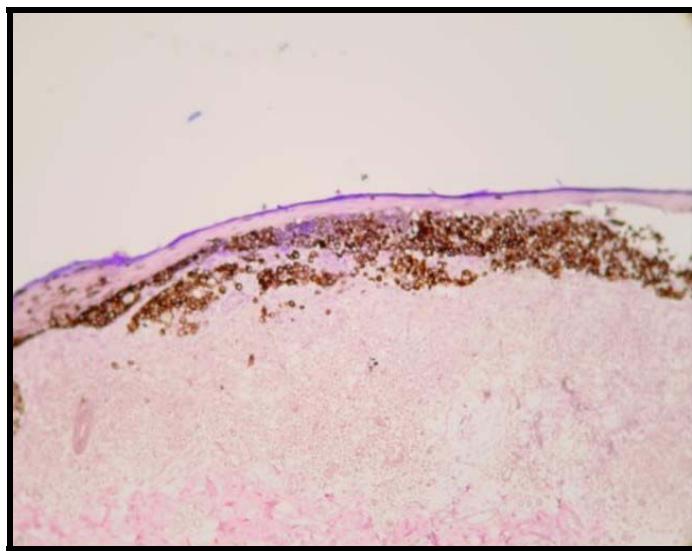
**Figura 2** – Espessura após imunohistoquímica – 0.5mm (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 100x), caso 14.



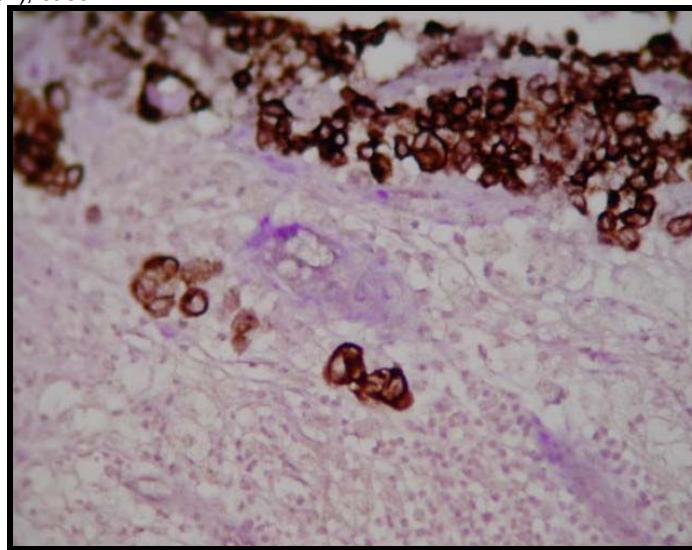
**Figura 3** – Células de melanoma MELAN-A positivas no infiltrado linfocitário ativo (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 400x), caso 14.



**Figura 4** - Melanoma com Breslow de 0.36mm apresentando infiltrado linfocitário ativo e melanófagos (HE 100x), caso 21.



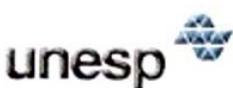
**Figura 5** - Identificação de células de melanoma MELAN-A positivas no infiltrado linfocitário ativo. Espessura após imunohistoquímica - 0.40mm (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 100x), caso 21.



**Figura 6** – Células MELAN-A positivas no Infiltrado linfocitário ativo (Imunohistoquímica técnica da ABC – contracoloração com Giemsa 400x), caso 21



## Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br  
e-mail Presidência: mibvianna@uol.com.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de  
abril de 1997

Botucatu, 21 de outubro de 2.003

OF. 459/2003-CEP  
MACAH/asc

Ilustríssima Senhora  
Profª. Drª. Mariângela Esther Alencar Marques  
Departamento de Patologia  
Faculdade de Medicina do Campus de Botucatu.

Prezada Profª. Mariangela,

De ordem da Senhora Vice-Coordenadora no exercício deste CEP, informo que as recomendações contidas no ofício 422/2003-CEP, referente ao Projeto de Pesquisa “**Melanoma maligno: Estudo microestadiamento**”, de autoria de Ana Gabriela Sálvio, orientada por Vossa Senhoria, foram satisfatoriamente atendidas, permanecendo parecer **favorável** concedido em 06/10/2003

### **Situação do Projeto: Aprovado**

Sendo só para o momento, aproveito o ensejo para renovar os protestos de elevada estima e distinta consideração.

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP

Comitê de Ética em Pesquisa  
Recebi nos 31/10/05

  
Alberto Sartori Chelluppi  
Secretário do CEP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

FACULDADE DE MEDICINA

Seção de Pós-Graduação

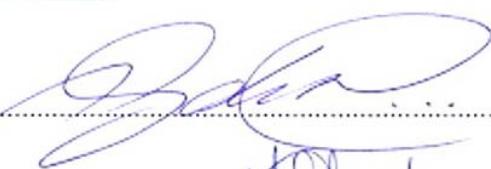
BOTUCATU, SP - RUBIÃO JÚNIOR - CEP 18.618-970 - PABX (0xx14) 3811-6022

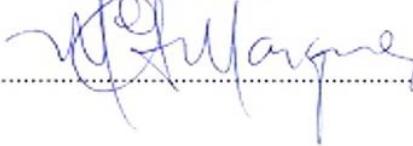
#### JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa "Melanoma Maligno: Estudo do microestadiamento", aprovado pelo CEP em 21/10/03, teve seu título alterado para "Imuno-histofenomica e estadiamento do melanoma fino", sem nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Tese de Doutorado.

Botucatu, 31/10/05

Nome/Aassinatura do(a) aluno(a) .....  
ANA GABRIELA SALVY 

Nome/Aassinatura do(a) orientador (a) .....  
MARIANGELA E. A. MARQUES 

Programa de Pós Graduação em PATOLOGIA