

RAUL ALBERTO ANSELMÍ JÚNIOR

**INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL (TIL) EM MELANOMAS
PRIMÁRIOS: ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA E CORRELAÇÃO
PROGNÓSTICA**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre.
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, Parasitologia e Patologia,
Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná**

Orientador: Profa. Dra. Lúcia de Noronha

**CURITIBA
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

À Karina , meu grande amor,
e ao Lorenzo, minha grande alegria.
A meus pais, Raul e Eni, pelo amor e
estímulo durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

À PROFA. DRA. LÚCIA DE NORONHA,

por seu exemplo de obstinação, sua amizade e orientação desta dissertação, e por ter me impulsionado sempre a diante durante as etapas deste projeto.

Ao DR. LUIZ MASAKATSO NOMURA,

por ter me acolhido em meu início de carreira e ter me incentivado a buscar o caminho da honestidade, seriedade e competência em prol dos doentes.

Ao DR. PAULO CÉSAR ANDRIGUETTO,

pelo exemplo profissional e de pessoa humana, e pela oportunidade que me dá de convívio e aprendizado consigo, o que para mim é um privilégio singular.

Ao PROF. DR. LUIZ FERNANDO BLEGGI TORRES,

por me considerar como amigo e se interessar por minha formação, pelo notável profissional que é, e por ter me estimulado a trabalhar com a Dra. Lúcia de Noronha.

Ao PROF. DR. CÍCERO DE ANDRADE URBAN,

pelo incentivo à busca pelo conhecimento e pela verdade, e também por sua amizade.

Aos DOENTES,

que são o motivo de minha profissão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE GRÁFICOS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 OBJETIVO GERAL.....	6
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 HISTÓRICO DO MELANOMA.....	8
3.2 CONCEITOS E EPIDEMIOLOGIA.....	8
3.3 FATORES PROGNÓSTICOS DO MELANOMA.....	11
3.3.1 Fatores Prognósticos Clínicos.....	12
3.3.1.1 Idade do Paciente.....	12
3.3.1.2 Sexo.....	13
3.3.1.3 Localização Tumoral.....	13
3.3.1.4 Envolvimento Linfonodal.....	13
3.3.1.5 Metástases à distância.....	14
3.3.1.6 Desidrogenase Láctica.....	15
3.3.2 Fatores Prognósticos Anátomopatológicos e Moleculares.....	15
3.3.2.1 Presentes no Estadiamento Revisado da AJCC.....	15
3.3.2.1.1 Espessura Tumoral (Índice de Breslow).....	16
3.3.2.1.2 Ulceração.....	16
3.3.2.1.3 Nível de Clark.....	17
3.3.2.1.4 Microsatélites.....	17
3.3.2.2 Não-Presentes no Estadiamento Revisado da AJCC.....	18
3.3.2.2.1 Vascularização tumoral.....	18

3.3.2.2.2 Invasão linfovascular.....	18
3.3.2.2.3 Taxa Mitótica.....	19
3.3.2.2.4 Regressão.....	19
3.3.2.2.5 Mutação do BRAF.....	20
3.3.2.2.6 Infiltrado Linfocitário Tumoral (TIL).....	20
3.4 RESPOSTA IMUNE TUMORAL.....	21
3.4.1 Aspectos Gerais.....	21
3.4.2 Funções das Células T Antitumorais Maduras.....	23
3.5 INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL (TIL) NO MELANOMA.....	29
3.5.1 Conceitos e Fisiopatogenia do TIL.....	29
3.5.2 Aspectos Moleculares e Imunomarcacão do TIL.....	40
3.6 IMUNOHISTOQUÍMICA E MARCADORES PARA O MELANOMA....	43
3.7 MICROARRANJOS TECIDUAIS (TMA) NO MELANOMA.....	45
4 MÉTODO	47
4.1 A AMOSTRA.....	48
4.1.1 Critérios de Inclusão e Revisão de Dados.....	48
4.1.2 Critérios de Exclusão.....	48
4.2 DADOS CLÍNICO-CIRÚRGICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS TABULADOS.....	49
4.3 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	49
4.3.1 Microarranjos Teciduais (TMA).....	50
4.3.2 Técnica de Imunohistoquímica.....	54
4.3.2.1 Anticorpo CD3.....	54
4.3.2.2 Anticorpo CD4.....	54
4.3.2.3 Anticorpo CD8.....	55
4.3.2.4 Anticorpo CD20.....	55
4.3.2.5 Anticorpo CD25.....	55
4.3.2.6 Anticorpo CD57.....	56
4.3.3 Materiais para Obtenção das Fotomicrografias e dos Resultados...	57
4.3.4 Método de Leitura.....	58
4.3.5 Correlação de Todos os Dados e Análise Estatística.....	64
5 RESULTADOS	65
5.1 ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS.....	66
5.1.1 Idade.....	66

5.1.2 Sexo.....	67
5.1.3 Localização Tumoral.....	68
5.2 ANÁLISE DOS DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS.....	69
5.2.1 Índice de Breslow.....	69
5.2.2 Nível de Clark.....	70
5.2.3 Taxa Mitótica.....	71
5.2.4 Ulceração Tumoral.....	72
5.2.5 Regressão Histológica.....	73
5.2.6 Satelitose Microscópica.....	74
5.2.7 Infiltrado Linfocitário Tumoral (TIL).....	75
5.2.7.1 TIL Comparado ao Sexo dos Pacientes com Melanoma.....	76
5.2.7.2 TIL Comparado à Idade dos Pacientes com Melanoma.....	76
5.2.7.3 TIL Comparado à Localização Tumoral nos Pacientes com Melanoma.....	76
5.2.7.4 TIL Comparado ao Índice de Breslow nos Pacientes com Melanoma.....	76
5.2.7.5 TIL Comparado ao Nível de Clark nos Pacientes com Melanoma.....	77
5.2.7.6 TIL Comparado à Taxa Mitótica nos Pacientes com Melanoma.....	77
5.2.7.7 Ulceração Tumoral Comparada ao TIL nos Pacientes com Melanoma.....	77
5.2.7.8 Regressão Histológica Comparada ao TIL nos Pacientes com Melanoma.....	78
5.2.7.9 Satelitose Microscópica Comparada ao TIL nos Pacientes com Melanoma.....	78
5.3 ANÁLISE DOS DADOS IMUNOHISTOQUÍMICOS.....	80
5.3.1 Análise do Anticorpo Anti-CD4.....	80
5.3.1.1 Amostras Superficiais dos Melanomas Grossos.....	80
5.3.1.2 Amostras Profundas de Melanomas Grossos.....	81
5.3.1.3 Melanomas Finos.....	81
5.3.2 Análise do Anticorpo Anti-CD8.....	82
5.3.2.1 Amostras Superficiais dos Melanomas Grossos.....	82

5.3.2.2 Amostras Profundas dos Melanomas Grossos.....	82
5.3.2.3 Melanomas Finos.....	82
5.3.3 Análise do Anticorpo Anti-CD3.....	83
5.3.3.1 Amostras Superficiais dos Melanomas Grossos.....	83
5.3.3.2 Amostras Profundas dos Melanomas Grossos.....	83
5.3.3.3 Amostras de Melanomas Finos.....	83
5.3.4 Análise do Anticorpo Anti-CD20.....	84
5.3.4.1 Amostras Superficiais de Melanomas Grossos.....	84
5.3.4.2 Amostras Profundas de Melanomas Grossos.....	84
5.3.4.3 Amostras de Melanomas Finos.....	84
5.3.5 Análise do Anticorpo Anti-CD25.....	84
5.3.5.1 Amostras Superficiais de Melanomas Grossos.....	84
5.3.5.2 Amostras Profundas de Melanomas Grossos.....	85
5.3.5.3 Amostras de Melanomas Finos.....	85
5.3.6 Análise do Anticorpo Anti-CD57.....	85
5.3.6.1 Amostras Superficiais de Melanomas Grossos.....	86
5.3.6.2 Amostras Profundas de Melanomas Grossos.....	86
5.3.6.3 Amostras de Melanomas Finos.....	86
5.4 SOBREVIDA E EVOLUÇÃO.....	87
6 DISCUSSÃO.....	88
6.1 AMBIENTE DO ESTUDO.....	89
6.2 VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS DOS PACIENTES.....	90
6.3 CORRELAÇÃO DO TIL COM AS VARIÁVEIS IMUNOHISTOQUÍMICAS.....	96
6.4 SOBREVIDA E EVOLUÇÃO.....	101
7 CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS.....	106
ANEXOS.....	120

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO DE MELANOMA A PARTIR DOS MELANÓCITOS NORMAIS.....	9
FIGURA 2 – MODELO PARA ESTIMULAÇÃO DE IMUNIDADE ANTITUMORAL DE CÉLULA T CD4+ E CD8+, BASEADO NAS CÉLULAS T CD8+ INTERAGINDO COM CÉLULAS TUMORAIS E CÉLULAS T CD4+ INTERAGINDO COM CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS (APCs).....	24
FIGURA 3 - INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL (TIL) “BRISK”....	31
FIGURA 4 - INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL (TIL) “NONBRISK”.....	32
FIGURA 5 - INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL (TIL) “ABSENT”.....	33
FIGURA 6 – EXEMPLO DE LÂMINA CONTENDO AMOSTRAS PROVENIENTES DOS MICROARRANJOS TECIDUAIS....	52
FIGURA 7 – TOTAL DE LÂMINAS PROVENIENTES DOS MICROARRANJOS TECIDUAIS DESTE ESTUDO.....	53
FIGURA 8 - MICROSCÓPIO ACOPLADO AO COMPUTADOR PARA A CAPTURA DAS IMAGENS.....	57
FIGURA 9 - EXEMPLO DE AMOSTRA 100% ADEQUADA.....	58

FIGURA 10 - INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL (TIL).....	60
FIGURA 11 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD4 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA SUPERFICIAL (40X).....	61
FIGURA 12 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD8 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA SUPERFICIAL (40X).....	61
FIGURA 13 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD4 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA PROFUNDA (40X).....	61
FIGURA 14 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD8 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA PROFUNDA (40X).....	61
FIGURA 15 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD3 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA SUPERFICIAL (40X).....	62
FIGURA 16 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD20 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA SUPERFICIAL (40X).....	62
FIGURA 17 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD3 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA PROFUNDA (40X).....	62
FIGURA 18 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD20 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA PROFUNDA (40X).....	62
FIGURA 19 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD4 EM MELANOMA FINO (40X).....	63
FIGURA 20 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD8 EM MELANOMA FINO (40X).....	63
FIGURA 21 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD3 EM MELANOMA FINO (40X).....	63

FIGURA 22 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD20 EM MELANOMA FINO (40X).....	63
FIGURA 23 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD25 EM MELANOMA FINO (40X).....	63
FIGURA 24 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD57 EM MELANOMA FINO (40X).....	63

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 –	FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES COM MELANOMA.....	66
GRÁFICO 2 –	SEXO DOS PACIENTES COM MELANOMA.....	67
GRÁFICO 3 –	LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES.....	68
GRÁFICO 4 –	ÍNDICE DE BRESLOW (ESPESSURA TUMORAL EM MILÍMETROS).....	69
GRÁFICO 5 –	AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CLARK DOS MELANOMAS.....	70
GRÁFICO 6 –	TAXA MITÓTICA NOS MELANOMAS PRIMÁRIOS..	71
GRÁFICO 7 –	ULCERAÇÃO NOS MELANOMAS.....	72
GRÁFICO 8 –	REGRESSÃO HISTOLÓGICA NOS MELANOMAS..	73
GRÁFICO 9 –	SATELITOSE.....	74
GRÁFICO 10 –	TIL.....	75
GRÁFICO 11 –	MORTALIDADE x TIL.....	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPARAÇÃO DO TIL COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS. ANÁLISE UNIVARIADA E MULTIVARIADA.....	79
TABELA 2 - CORRELACIONA OS ANTICORPOS TESTADOS NO TIL BRISK E NONBRISK DOS MELANOMAS GROSSOS (AMOSTRAS SUPERFICIAIS E PROFUNDAS) E FINOS	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	- células dependentes de anticorpos
AJCC	- <i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	- célula apresentadora de antígeno
B	- <i>brisk</i>
CGA	- campos de grande aumento
CTL	- linfócito T citotóxico
DC	- célula dendrítica
GM-CSF	- fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
HE	- hematoxilina-eosina
HLA	- antígeno leucocitário humano
IFN- γ	- interferon- γ
IL-2	- interleucina-2
LDH	- desidrogenase láctica
MCAM	- molécula de adesão celular ao melanoma
MDA	- antígeno de diferenciação dos melanócitos
MF	- melanomas finos
MG	- melanomas grossos
MHC	- complexo maior de histocompatibilidade
NB	- <i>no brisk</i>
NK	- linfócito <i>natural killer</i>
P	- amostra profunda de melanomas grossos
S	- amostra superficial de melanomas grossos
TIL	- infiltrado linfocitário tumoral
TIM	- infiltração tumoral por macrófagos
TMA	- microarranjos teciduais

RESUMO

O objetivo deste estudo foi a avaliação histopatológica e imunohistoquímica do infiltrado linfocitário tumoral (TIL) presente em espécimes cirúrgicos de melanomas cutâneos primários em fase de crescimento vertical e sua correlação com a agressividade anatomopatológica e clínica da doença. Foram estudados 43 casos de melanomas primários não metastáticos de pacientes submetidos à cirurgia de 1997 a 2005. Após coleta dos dados clínicos, foi realizada revisão de todas os diagnósticos e feita sua classificação anatomopatológica. A seguir, com o auxílio da técnica de microarranjos teciduais, foram feitas tanto a análise do TIL de todas estas amostras, bem como a análise imunohistoquímica com os marcadores CD3, CD20, CD4, CD8, CD25 e CD57. A idade média dos pacientes foi de 62,2 anos, sendo 22 homens e 21 mulheres. O índice de Breslow foi maior que 1mm em 43,5% dos casos e menor ou igual a 1mm em 51,2% dos casos; em um caso o índice de Breslow foi não avaliável com exatidão, apesar de grosso, pela presença da ulceração. Todas as demais variáveis anatomopatológicas foram também avaliadas. O TIL foi brisk em 23,3% dos casos e no brisk em 73,7% dos casos. Dos melanomas finos, com índice de Breslow menor ou igual a 1mm, 59,1% dos casos apresentavam TIL no brisk, enquanto que 40,9% tinham o TIL do tipo brisk. Entre os melanomas com índice de Breslow maior que 1mm houve 95% de casos com TIL no brisk e 5% com TIL brisk. Dos pacientes com nível de Clark II, 75% tiveram TIL no brisk e 25% apresentavam TIL brisk. Dos pacientes com nível de Clark maior que dois, 77,8% tinham TIL do tipo no brisk, e 22,2% com TIL brisk. Dos 33 melanomas com taxa mitótica menor ou igual a 4, 72,7% tiveram TIL no brisk, enquanto que 27,3% brisk. 90% dos melanomas com taxa mitótica maior que 4, 90% tiveram o TIL classificado como no brisk. Na imunomarcagem com os anticorpos, houve uma marcação intensa para o CD3 de maneira constante, sendo presente também CD8 e CD4 como os próximos mais marcados, seguidos pelo CD20, CD57 e CD25. Houve várias relações entre valores das contagens das subpopulações linfocitárias com o índice de Breslow e o tipo do TIL. Em conclusão, em nossa série houve predomínio do TIL no brisk sobre o brisk; encontrou-se uma relação inversa entre a densidade do TIL e o índice de Breslow dos melanomas cutâneos, os melanomas espessos tendo TIL no brisk em quase a totalidade dos casos, o que não aconteceu com os melanomas finos; não se encontrou mudança no padrão do TIL conforme o nível de Clark; houve mudança no padrão da subpopulação de linfócitos CD4 conforme a localização do TIL; houve alta contagem de linfócitos CD3+ e baixa contagem de CD20+. Houve imunomarcagem positiva para CD25 e para CD57, em valores baixos, com o CD57 marcando pouco mais forte que o CD25.

Palavras Chave: Melanoma cutâneo; Imunohistoquímica; Microarranjos teciduais; Infiltrado linfocitário tumoral, Resposta imune tumoral

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in primary cutaneous melanoma in vertical growth phase and its correlation with clinical and anatomopathological aggressivity of the disease. This study was composed by 43 cases of primary cutaneous melanoma, non metastatic, presenting in patients undergone to surgery from 1997 to 2005. After collect the clinical data, a review of all the diagnosis was done, and the anatomopathological classification was redone. At that time, using the tissue microarray technique, the TIL analysis was done and also the immunohistochemical with CD3, CD20, CD4, CD8, CD25 and CD57 markers. Mean age was 62,2 and there were 22 men and 21 women in the study. The Breslow was bigger than 1mm in 43,5% of cases, and smaller than 1mm in 51,2% of cases; in one case the Breslow index was difficult to measure, despite it was thick, because the ulceration. All the others anatomopathologic items were also evaluated. 59,1% of the thin melanomas presented no brisk TIL, whereas 40,9% of them presented brisk TIL. Among the thicker melanomas, the no brisk TIL was present in 95% of cases, and only 5% of cases with brisk TIL. Among the patients with Clark II, 75% were classified with no brisk TIL, and 25 % presented a brisk TIL. In the melanomas with Clark bigger than II, 77,8% had a no brisk TIL, and 22,2% of the cases were brisk. Concerning mitotic rate, 72,7% of melanoma with low mitotic rate had a no brisk TIL, whereas 27,3% had a brisk TIL. In the melanomas with a mitotic rate bigger than 4, 90% had a no brisk TIL. The antibody against CD3 was consistently marked; the next most marked were CD8 and CD4, followed by CD20, CD57 and CD25. There were several relations among the lymphocytes subpopulations count values, the TIL and the other anatomopathological conditions. In conclusion, in the melanomas of our study, there were a inverse relation between the TIL density and the Breslow index; it was not found a change in the pattern of the TIL according the Clark level; there was a change in the lymphocytes subpopulation according the TIL localization; a high CD3+ cells count was found, with a low count for CD20+ cells; there was a positive count for CD25 and CD57, in low values, with the CD57 stronger then the CD25.

Key words: Cutaneous melanoma; Immunohistochemical staining; Tissue microarray; Tumor infiltrating lymphocytes; Tumor immune response

1 INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é uma neoplasia originada da transformação maligna de melanócitos localizados na camada basal da epiderme. A função dessas células é sintetizar e transferir o pigmento melânico aos queratinócitos e desta forma protegê-los dos danos causados pela radiação ultra-violeta. O melanoma cutâneo é uma das neoplasias mais agressivas e sua incidência é crescente, principalmente entre a população branca (WEINLICH, 2003). Melanomas causam mais que 75% das mortes por câncer de pele, e o prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom, se detectado nos estádios iniciais. Nos últimos anos houve uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do mesmo. Nos países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos é de 73%, enquanto que, para os países em desenvolvimento, a sobrevida média é de 56%. A média mundial estimada é de 69% (INCA, 2006).

Não há cura efetiva nos pacientes com melanoma disseminado. Portanto, é importante estimar o risco de progressão nos pacientes, preferencialmente no momento do diagnóstico. Dentre os fatores preditivos de sobrevida em melanomas cutâneos primários, os mais importantes são a espessura da lesão (índice de Breslow), a presença de ulceração e o envolvimento de linfonodos. Idade, sexo, localização anatômica e lesões satélites também são importantes. Há ainda fatores sendo investigados, como a vascularização tumoral, invasão angiolinfática, índice mitótico, presença de regressão e infiltrado inflamatório tumoral (HOMSI, 2005).

Dados clínicos e histológicos de melanomas cutâneos primários fornecem informações prognósticas úteis, porém o curso clínico desta neoplasia é imprevisível e há necessidade de fatores adicionais para prever sua evolução (RICANIADIS, 2001).

Apesar de a biologia do melanoma ter sido muito estudada nos últimos

30 anos, seja de um ponto de vista clínico, bem como em modelos experimentais animais, ainda se conhece pouco dos eventos moleculares e dos mecanismos implicados na transformação maligna dos melanócitos e na progressão tumoral do melanoma.(VERONESI, 2000).

Recentemente, técnicas avançadas de biologia molecular têm possibilitado a identificação de marcadores moleculares que estão sendo investigados na tentativa de estabelecer uma correlação da sua expressão com os fatores prognósticos atuais, o risco de progressão, metástase e sobrevida dos pacientes com melanoma. Entre os marcadores moleculares envolvidos na patogênese do melanoma estão os reguladores de ciclo celular, componentes apoptóticos e mecanismos de adesão celular (FIGUEIREDO, 2003).

Para avaliar a resposta inflamatória tumoral há marcadores moleculares de células inflamatórias, como linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Sabe-se que em todas as etapas de crescimento tumoral existe um certo grau de reação linfocitária, mas a correlação entre o grau desta reação e o prognóstico dos melanomas ainda não está bem estabelecida.

Propomos, com este projeto, avaliar a resposta inflamatória tumoral em melanoma primários, e estudar a sua correlação com o prognóstico destes tumores em pacientes selecionados. Realizamos análise morfológica e imunofenotípica do infiltrado linfocitário tumoral (TIL) em melanomas primários de pacientes operados no Hospital Nossa Senhora das Graças no período de 1997 a 2005, utilizando técnicas de coloração histológica e imunohistoquímica, sendo que para a realização desta última foi utilizada técnica de microarranjos teciduais (TMA). Os resultados deste estudo podem se juntar aos trabalhos existentes na literatura que indicam o TIL como fator prognóstico em melanomas, bem como podem ser úteis como bibliografia àqueles que estudam novas terapêuticas imunológicas contra o melanoma.

A hipótese deste projeto, portanto, é que o TIL em melanomas cutâneos primários pode prever a progressão e o prognóstico destes tumores, isto é, existe uma correlação entre o TIL e a agressividade do melanoma cutâneo primário.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliação histopatológica e imunohistoquímica do infiltrado linfocitário tumoral (TIL) presente em espécimes cirúrgicos de melanomas cutâneos primários em fase de crescimento vertical e sua correlação com a agressividade anatomopatológica e clínica da doença.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

a) Avaliar em cortes de hematoxilina-eosina (HE) a localização, a intensidade e o tipo do TIL;

b) Avaliar, através da imunohistoquímica, a imunofenotipagem dos linfócitos que compõem o TIL, caracterizando, assim, subpopulações linfocitárias (CD4, CD8, CD3, CD20, CD25 e CD57);

c) Correlacionar os dados obtidos com a avaliação do TIL com dados preditivos e prognósticos anatomopatológicos como taxa mitótica, profundidade de invasão e grau de extensão, além de tipo histológico;

d) Correlacionar os dados obtidos com a avaliação do TIL com dados prognósticos clínicos como tamanho e localização da lesão, estágio de doença e idade e sexo do paciente.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

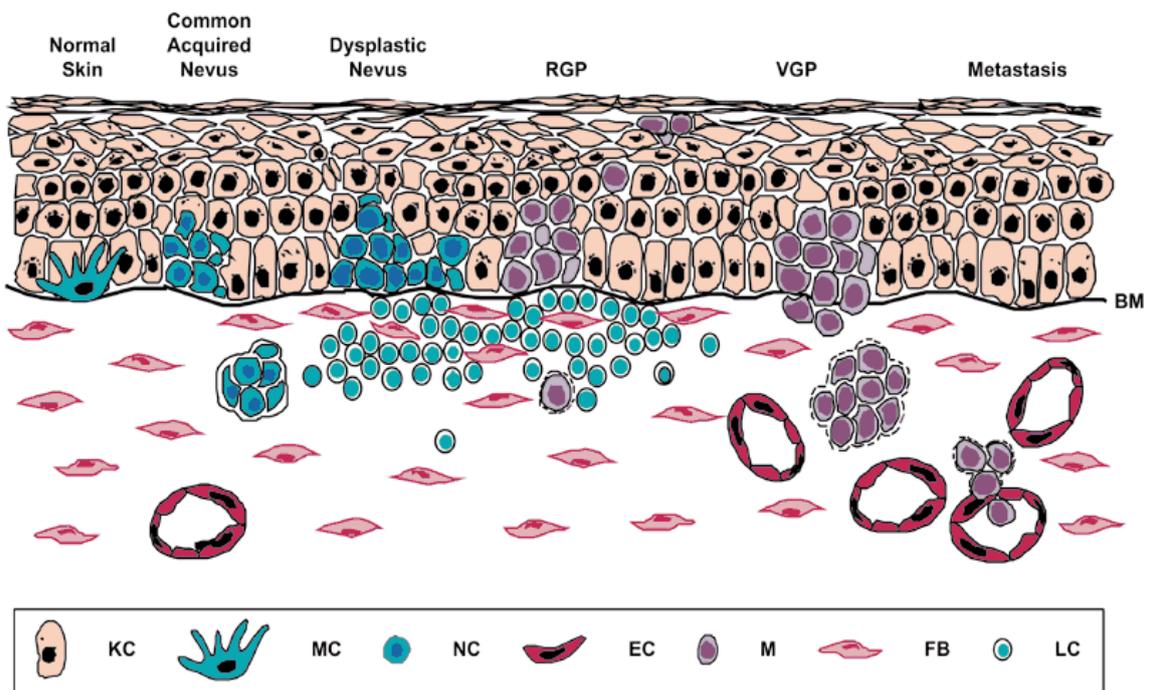
3.1 HISTÓRICO DO MELANOMA

A primeira menção acreditada ser de melanoma foi por Hippocrates, no quinto século antes de Cristo. Paleopatologistas descobriram metástases ósseas difusas e massas melanóticas arredondadas na pele de múmias peruanas do quarto século antes de Cristo. Algumas referências a “tumores pretos fatais com metástases e fluidos pretos no corpo” são encontradas na literatura européia entre 1650 e 1760. René Laënnec discutiu “la melanose” em 1806 e Robert Carswell, em 1838, foi o primeiro a empregar a palavra melanoma. (URTEAGA, 1966)

3.2 CONCEITOS E EPIDEMIOLOGIA

O melanoma cutâneo é um tumor que se desenvolve da transformação maligna dos melanócitos, que são células derivadas da crista neural, produtoras de pigmento que residem na camada basal da epiderme na pele humana. Ele apresenta uma elevada agressividade biológica, podendo originar-se a partir de uma lesão pigmentada benigna ou da pele normal. Sucessivamente, pode invadir a derme, disseminar-se aos linfonodos regionais e apresentar metástases à distância (Figura 1).

FIGURA 1 – PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO DE MELANOMA A PARTIR DOS MELANÓCITOS NORMAIS. NEVOS SÃO CARACTERIZADOS POR CRESCIMENTO CELULAR ABERRANTE, CONSISTINDO EM NINHOS DE NEVÓCITOS AUMENTADOS, COALESCENTES, QUE MOSTRAM DIFERENTES GRAUS DE DISPLASIA CITOLOGICA. PROGRESSÃO FUTURA RESULTA EM CÉLULAS MALIGNAS, QUE CRESCEM SOMENTE DENTRO OU EM ÍNTIMA PROXIMIDADE DA EPIDERMIS (FASE DE CRESCIMENTO RADIAL). EVENTUALMENTE, AS CÉLULAS ADQUIREM A HABILIDADE DE INVADIR PROFUNDAMENTE PARA DENTRO DA DERME (FASE DE CRESCIMENTO VERTICAL) E ENTÃO PARA VASOS LINFÁTICOS E SANGÜÍNEOS, LEVANDO À DISSEMINAÇÃO SISTÊMICA (MELANOMA METASTÁTICO). (DEVITA et al., 2005)



LEGENDA: NORMAL SKIN= PELE NORMAL; COMMON ACQUIRED NEVUS= NEVO COMUM ADQUIRIDO; DYSPLASTIC NEVUS= NEVO DISPLÁSICO; RGP= FASE DE CRESCIMENTO RADIAL; VGP= FASE DE CRESCIMENTO VERTICAL; METASTASIS= METÁSTASES; BM= MEMBRANA BASAL; KC= QUERATINÓCITO; MC= MELANÓCITO; NC= CÉLULA NÉVICA; EC= CÉLULA ENDOTELIAL; M= CÉLULA DO MELANOMA; FB= FIBROBLASTO; LC= LINFÓCITO.

Infelizmente não há opções efetivas de tratamento capazes de curar ou aumentar a sobrevivência do indivíduo afetado após o melanoma se disseminar além do seu sítio primário. Reconhecido, portanto, como o câncer de pele mais fatal, e estando também entre os cânceres mais fatais de maneira geral, a sua incidência aumentou quinze vezes nos últimos 40 anos nos Estados Unidos, o que representa o maior aumento de incidência entre as neoplasias. A cada hora um americano morre de melanoma, e ele se mantém um dos tipos de câncer mais comum entre os adultos jovens nos países industrializados. Além disso, de acordo com estatísticas de 1973 a 1997, o aumento da mortalidade por melanoma em indivíduos com 65 anos ou mais, especialmente homens, foi o segundo entre todos os tipos de câncer (NESTLE et al., 2003). Sua incidência estimada para 2006 nos Estados Unidos é de 62190 casos, com uma mortalidade de 7910 casos (NCI, 2006). No Brasil, a incidência estimada para 2006 é de 5800 casos, com uma maior taxa na região sul. Nos países desenvolvidos a sobrevivência média estimada em cinco anos é de 73% enquanto que, para os países em desenvolvimento a sobrevivência média é de 56%. A média mundial estimada é de 69% (INCA, 2006).

Como em muitos cânceres, tanto a predisposição genética como a exposição a agentes ambientais são fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma. Indivíduos com cabelo claro e pele clara, e aqueles que sofrem facilmente queimaduras solares, ou com história de queimadura solar severa prévia são de maior risco que aqueles com pele mais escura. O componente ultra-violeta da luz solar causa dano à pele e aumenta o risco de câncer de pele como o melanoma. Parece que o risco de melanoma está mais associado com exposição solar intensa e intermitente que com exposição solar cumulativa (com exceção do melanoma lentigo maligno). A incidência de melanoma em pessoas de pele clara é maior quanto mais próximo da linha do equador estiver a residência, com a maior incidência encontrada na Austrália; isso reforça a importância do dano induzido pelos raios ultra-violeta na patogênese do

melanoma. (MARKS, 2000). Nos anos 20, a moda feminina se tornou mais reveladora, e à designer de moda francesa Coco Chanel, que desenvolveu um bronzeado em uma viagem de Paris a Cannes, é creditada a tendência moderna dos banhos de sol (GILCHREST, 1999). Como nossas roupas modernas expõem mais a pele que anteriormente, houve um aumento significativo dos cânceres de pele, incluindo o melanoma.

História familiar de melanoma, aumento do número de nevos comuns ou displásicos e tendência a sinais na pele também aumentam o risco de melanoma (TUCKER et al., 1997). Dez por cento dos pacientes de melanoma tem um caso de melanoma na família.

O melanoma cutâneo pode ser subdividido em diversos subtipos, principalmente baseados na localização anatômica e padrões de crescimento. Na maioria dos subtipos é observada uma progressão a fases histológicas distintas. A progressão dos melanomas da fase de crescimento radial (RGP) para a fase de crescimento vertical (VGP) é acompanhada com um decréscimo nas opções de tratamento, taxas de cura e de sobrevida. A maioria dos subtipos de melanoma demonstra uma fase de crescimento radial lenta, restrita à epiderme, seguida por uma fase de crescimento vertical potencialmente mais rápida (CLARK, et al., 1984). As células de melanoma em fase de crescimento radial se estendem para cima em direção à epiderme (propagação pagetóide) mas se mantêm in situ e perdem a capacidade de invadir a derme e metastatizar. O melanoma em fase de crescimento radial é geralmente curável por cirurgia excisional. O melanoma em fase de crescimento vertical invade a derme e estruturas profundas e é potencialmente metastatizante (MEIER et al., 1998; RUSCIANO, 2000).

3.3 FATORES PROGNÓSTICOS DO MELANOMA

O melanoma pode ser ainda classificado em estadios clínicos de acordo

com fatores prognósticos significativos (BALCH et al., 2001). Em 2002, a *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) aprovou uma nova versão do sistema de estadiamento do melanoma. As mudanças foram validadas com uma análise de fatores prognósticos que envolveu 17600 pacientes com melanoma (BALCH et al., 2001a). O sistema revisado inclui as seguintes características: (1) espessura da lesão, presença ou ausência de ulceração mas não nível de invasão são os preditores dominantes de sobrevida em pacientes com melanoma localizado, (2) o número de linfonodos metastáticos mais que suas dimensões e a diferenciação de linfonodos envolvidos microscopicamente ou macroscopicamente, (3) metástases satélites perto de um melanoma primário e metástases in-transit se consolidaram como uma única entidade de estadiamento que foi agrupada em doença estágio III, (4) informação de estadiamento obtida de mapeamento linfático e biópsia de linfonodo sentinela, e (5) para doentes com doença metastática, o sítio das metástases e o nível de desidrogenase láctica. Porém, outros fatores não incluídos no sistema de estadiamento revisado podem alterar o prognóstico, a sobrevida e o tratamento (BALCH, C.M., 1992).

3.3.1 Fatores Prognósticos Clínicos

3.3.1.1 Idade do Paciente

Pacientes idosos se apresentam mais frequentemente com melanomas espessos e ulcerados (BALCH, C.M., 1992), e muitos estudos tem relacionado a idade como um fator prognóstico independente (LEITER et al., 2004; HUBALEWSKA et al., 2003; CHANG et al., 2003). Em um grande estudo com mais de 17000 pacientes, cada 10 anos de aumento na idade foi associado com um declínio em ambas as taxas de sobrevida de 5 e 10 anos (BALCH et al, 2001a).

3.3.1.2 Sexo

Muitos estudos relataram que mulheres têm melhor prognóstico quando comparadas aos homens, até mesmo em pacientes com metástases nodais (SCHUCHTER, 1996; MASBACK et al., 2001; SLINGLUFF et al., 1988; VOSSAERT et al., 1992). Um estudo com 488 pacientes sem evidência de doença metastática mostrou 86% de taxa de sobrevida em 10 anos para mulheres comparados com 68% para homens (SCHUCHTER et al., 1996). Mulheres geralmente apresentam lesões mais delgadas com menor presença de ulceração que os homens (BALCH et al., 1992; VOSSAERT et al., 1992). O risco de melanoma não está associado com idade na menarca, estado menopausal, uso de terapia de reposição hormonal, paridade, idade da primeira gestação, ou uso de anticoncepcionais orais.

3.3.1.3 Localização Tumoral

Muitos estudos tem relatado a correlação entre prognóstico e localização anatômica, mostrando que lesões das extremidades têm um melhor prognóstico que os melanomas de pescoço, cabeça e tronco (SCHUCHTER et al., 1996; MASBACK et al., 2001; SLINGLUFF et al., 1993). Na ausência de doença metastática e para todas as variações de espessura tumoral, uma taxa de sobrevida em 10 anos de 90% foi observada quando o melanoma primário foi nas extremidades, comparado com 70% quando no tronco, cabeça ou pescoço .

3.3.1.4 Envolvimento Linfonodal

Na análise da AJCC de 2001, 49% de todos os pacientes com metástases linfonodais sobreviveram em 5 anos e 37% sobreviveram em 10

anos (BALCH et al., 2001a). No sistema de estadiamento de melanoma revisado em 2001, N1 se refere a metástase para um linfonodo, N2 para dois a três linfonodos e N3 para quatro ou mais linfonodos (BALCH et al., 2001a; BALCH, et al., 2001b). Este agrupamento de acordo como o número de linfonodos metastáticos envolvidos foi que se correlacionou melhor com as taxas de SOBREVIDA em 5 anos (CHANG et al., 2003; BALCH et al., 2001b).

O estadiamento para pacientes linfonodo-negativos com melanomas intermediários para espessos (>1mm) melhorou com o uso do mapeamento linfático e biópsia do linfonodo sentinela (DESSUREAULT et al., 2001). Este procedimento evoluiu nos últimos anos e envolve a injeção de de um corante azul e um colóide radiomarcado na pele ao redor do sítio do tumor, seguido pela dissecação do linfonodo corado e radiomarcado. O linfonodo então é cuidadosamente examinado quanto à presença de depósitos metastáticos. Metástases linfonodais patologicamente documentadas (tanto por dissecação linfonodal eletiva como por dissecação do linfonodo sentinela) são definidas como microscópicas, e metástases linfonodais documentadas clinicamente ou radiologicamente são definidas como macroscópicas. As taxas de sobrevida para estes dois grupos de pacientes são significativamente diferentes. As taxas de sobrevida em 10 anos na presença de linfonodo único microscópico vs linfonodo macroscópico são de 63% vs 47% respectivamente (BALCH et al., 2001a). Estudos para a detecção de níveis submicroscópicos de doença linfonodal estão em andamento atualmente (SHIVERS et al., 1998; SUNG et al., 2001).

3.3.1.5 Metástases à distância

O tempo de sobrevida média encontrado em um estudo com 1521 pacientes tratados de melanoma cutâneo, com metástases à distância, foi de 7,5 meses (BARTH et al., 1995). O sistema de estadiamento revisado de

melanoma divide os pacientes com metástases à distância em três grupos baseado na localização do órgão envolvido: disseminação subcutânea ou linfonodos à distância, envolvimento pulmonar, e outro envolvimento de órgão visceral. Uma diferença sobrevida média de 1 ano foi encontrada entre estes grupos. Em 1158 pacientes com metástases à distancia, aqueles com envolvimento somente de linfonodos tiveram um prognóstico melhor que aqueles com envolvimento de pulmão ou outro órgão visceral (taxas de sobrevida em 1 ano foram de 59%, 57% e 41%, respectivamente) (BALCH et al., 2001a; BALCH et al., 2001b). Além do sítio das metástases, o intervalo livre de doença entre a doença inicial e a metastática, bem como o estágio da doença precedendo as metástases à distância tiveram um papel em prever sobrevida na doença metastática. Uma apresentação incomum mas muito reconhecida de melanoma é a de sítio primário desconhecido. Esta apresentação é encontrada mais freqüentemente em linfonodos regionais, pulmão, fígado, e tecido subcutâneo, mas pode ocorrer em numerosos outros sítios. A análise imunohistoquímica tem sido útil em determinar a origem do tumor.

3.3.1.6 Desidrogenase Láctica (LDH)

O nível sérico elevado de LDH foi um dos melhores fatores preditivos de decréscimo na sobrevida em uma análise multivariada (BALCH et al., 2001b).

3.3.2 Fatores Prognósticos Anátomopatológicos e Moleculares

3.3.2.1 Presentes no Estadiamento Revisado da AJCC

3.3.2.1.1 Espessura Tumoral (Índice de Breslow)

A espessura tumoral e a ulceração são os fatores prognósticos independentes mais poderosos para o melanoma cutâneo localizado (BALCH et al., 2001a; SCHUCHTER et al., 1996; SOONG et al., 1992; BRESLOW et al., 1970). A profundidade tumoral é medida em milímetros da camada granular da epiderme até a célula tumoral mais profunda. Aumento da espessura tumoral está associado com sobrevida mais pobre. Na versão de 1997 do sistema de estadiamento do melanoma, o ponto de transição entre um melanoma T1 e um T2 foi definido como 0,75mm (BUZAID et al., 1997). No sistema da AJCC de 2002, a espessura do melanoma é estratificada em quatro categorias: $\leq 1,0$ mm, 1,01-2,0mm, 2,01-4.0mm, e >4 mm (BALCH et al., 2001b). A taxa de sobrevida global em 5 anos nos pacientes com melanomas delgados sem outros fatores prognósticos adversos é de 95% ou mais. Menos de 5% dos pacientes com estas características tem micrometástases linfonodais (GERSHENWALD et al., 1999).

3.3.2.1.2 Ulceração

Ulceração é definida histologicamente como a ausência de uma epiderme intacta cobrindo uma porção significativa do tumor primário (BALCH, C.M., 1980). Como já mencionado, as duas características independentes mais poderosas do melanoma cutâneo primário são ulceração (que não estava presente no sistema de estadiamento antigo) e espessura tumoral. Estes fatores são altamente relacionados entre si; estudos têm mostrado que a incidência de ulceração no melanoma cresce com o aumento da espessura tumoral, variando de 6-12% para melanomas delgados a 63%-72,5% para lesões espessas (>4 mm) (BALCH et al., 2001a; BALCH et al., 1980). A presença de ulceração diminui a sobrevida em todas as categorias de

espessura tumoral, sendo que o maior decréscimo – 22% - acontece nos tumores espessos (>4mm) (BALCH et al., 2001a). Esta observação levou à inclusão da ulceração como o segundo determinante da classificação T no novo sistema de estadiamento e como único fator do tumor primário a modificar o prognóstico da doença linfonodal positiva (BALCH et al., 2000).

3.3.2.1.3 Nível de Clark

O nível de Clark tem sido usado para descrever o envolvimento do tumor dentro das estruturas cutâneas e subcutâneas. Nível I corresponde ao crescimento intraepidermal com membrana basal intacta, nível II corresponde à invasão da derme papilar, nível III é o envolvimento tumoral da derme papilar e junção entre derme papilar e reticular, nível IV é a invasão do tumor na derme reticular, e nível V é a invasão da gordura subcutânea pelas células tumorais (MARCOVAL et al., 1996). O nível de Clark é mais preditor de sobrevida em melanomas finos (<1mm), e é parte do sistema de estadiamento somente em tais lesões (BALCH et al., 2004). Para tumores mais espessos que 1mm, o nível de Clark é menos preditivo que a ulceração, idade do paciente ou localização tumoral, e também tem utilidade limitada.

3.3.2.1.4 Microsatélites

Microsatélites são ninhos discretos de tumor maiores que 0,05mm de diâmetro que são separados do corpo do tumor por colágeno normal reticular ou gordura subcutânea. Apesar de serem raras em tumores menores que 1,5mm, quando estiveram presentes a sobrevida foi de 36% comparada a 89% para aqueles sem microsatélites (DAY et al., 1981). Os microsatélites também estão associados a um aumento na frequência das metástases linfonodais regionais (de 12 para 53%) em tumores maiores que 1,5mm (HARRIST et al.,

1984). A presença de metástases satélites microscópicas ou clínicas perto de um melanoma primário bem como metástases in-transit entre o melanoma primário e os linfonodos regionais foi incluída no sistema de estadiamento revisado para estágio III como N2c (BALCH et al., 2001b).

3.3.2.2 Não-Presentes no Estadiamento Revisado da AJCC

3.3.2.2.1 Vascularização tumoral

A vascularização tumoral é a formação de novos microvasos na derme da base de um melanoma invasivo. É associada com o desenvolvimento da fase vertical de crescimento em melanomas delgados (MARCOVAL et al., 1996; MARCOVAL et al., 1997). Quatro padrões de vascularização tumoral são descritos: ausente, esparsa, moderada e proeminente. Aumento da vascularização tumoral é mais provável em melanomas ulcerados e espessos (KASHANI-SABET et al., 2002; STRAUME et al., 1999). A extensa utilização deste fator é limitada pela subjetividade da avaliação do patologista e a reprodutibilidade da avaliação entre observadores. Apesar de um estudo ter mostrado que o grau da vascularização tumoral foi o fator histopatológico mais importante determinando sobrevida global, mais estudos são necessários para esclarecer o impacto da vascularização tumoral como preditor de sobrevida (KASHANI-SABET et al., 2002).

3.3.2.2.2 Invasão linfovascular

Envolvimento vascular significa invasão de células tumorais dentro da microvasculatura na derme, tanto circundando o endotélio (invasão incipiente),

como penetrando no endotélio e entrando na luz do vaso (invasão vascular). Vários relatos notaram que invasão vascular aumentou significativamente o risco de recidiva, envolvimento linfonodal, metástases à distância, e morte, e o impacto na sobrevida do indivíduo portador de melanoma foi similar àquele da ulceração (KASHANI-SABET et al., 2001; KASHANI-SABET et al., 2004; DADRAS et al., 2003).

3.3.2.2.3 Taxa Mitótica

A taxa mitótica é medida como número de mitoses por milímetro quadrado (ZETTERSTEN et al., 2003), ou número de mitoses por 10 campos de grande aumento da neoplasia. Tem sido sugerido que um maior índice mitótico pode simplesmente representar células com maior tempo de duplicação, e assim pode ser um preditor de prognóstico pobre (SPATZ et al., 1998).

3.3.2.2.4 Regressão

Regressão é a substituição do tecido tumoral por fibrose, células de melanoma degeneradas, proliferação linfocítica e telangiectasias (ZETTERSTEN et al., 2003). A incidência de regressão é maior que 58% em melanomas iguais ou menores que 0.75% (MCGOVERN et al., 1983). Apesar de a maioria dos estudos não terem encontrado um papel significativo para regressão em determinar sobrevida, um estudo mostrou que regressão é fator prognóstico adverso em prever sobrevida em melanomas delgados (SLINGLUFF et al., 1988). Ainda faltam estudos para definição de regressão como fator preditor de prognóstico nos melanomas. Microscopicamente, a regressão pode ser definida como área de desaparecimento das células tumorais, associada à inflamação e à reparação na derme, com melanoma bem

definido nas adjacências, seja na epiderme ou na derme situada lateralmente. A tendência hoje é aceitar que a regressão seja um parâmetro que pode indicar evolução desfavorável, com possibilidade de metástase (SCOLYER et al., 2004). MASSI et al. (1999) registraram que, em melanomas finos (< 1,0mm), o parâmetro quantitativo da espessura do tumor e a espessura da regressão são importantes fatores independentes preditivos de progressão, ou seja, melanomas finos em pacientes com evolução desfavorável podem ser finos em virtude da regressão, podendo ter sido mais espessos no passado.

3.3.2.2.5 Mutação do BRAF

Corresponde à mutação mais freqüente (60-80%) observada no melanoma humano (DAVIES et al., 2002; BROSE et al., 2002). Pode ser encontrada tanto em nevos benignos como no melanoma (POLLOCK et al., 2003). Faltam estudos para determinação do seu real papel como indicador prognóstico para o melanoma cutâneo.

3.3.2.2.6 Infiltrado Linfocitário Tumoral (TIL)

O TIL representa a resposta imune às células de melanoma. Esta resposta é usualmente medida pelo nível do infiltrado linfocitário presente na base da fase de crescimento vertical do tumor e pode ser caracterizada como *brisk*, *nonbrisk* ou *absent* (ELDER et al., 1985; CLARK et al., 1986). *Brisk* se os linfócitos estão presentes difusamente pela fase de crescimento vertical; *nonbrisk* quando os linfócitos se encontram em um ou mais focos da fase de crescimento vertical do melanoma cutâneo; *absent* se não há linfócitos presentes, ou são presentes mas não infiltram o melanoma. A maioria da infiltração linfocitária *brisk* é encontrada em tumores finos (MIHM et al.; 1996). As taxas de sobrevida em 5 e 10 anos para melanoma com fase de

crescimento vertical e infiltração *brisk* são 77% e 55% respectivamente. Para tumores com infiltração *nonbrisk*, as taxas de sobrevida em 5 e 10 anos são respectivamente 53% e 45%, e para tumores com infiltração linfocitária tumoral ausente as taxas de sobrevida em 5 e 10 anos foram 37% e 27%, respectivamente (MIHM et al., 1996). É necessária uma definição mais uniforme da resposta do hospedeiro em termos do tipo e localização da infiltração para melhor determinar a importância da mesma. Uma importância indireta é no uso do TIL como nova terapia para o melanoma (ROSENBERG et al., 1994; ROSENBERG et al., 2004), apesar que são necessárias ainda mais pesquisas neste sentido.

3.4 RESPOSTA IMUNE TUMORAL

3.4.1 Aspectos Gerais

A pele é a principal barreira entre os tecidos internos e o meio externo juntamente com as mucosas. É um sistema efetor de defesa, pois pode gerar e suportar reações inflamatórias e imunológicas locais. Existe um tecido linfóide organizado e altamente especializado localmente, tanto na derme quanto na epiderme, composto principalmente por linfócitos T CD8+ e linfócitos T CD4+. Durante as respostas inflamatórias, os neutrófilos liberam fatores quimiotáticos solúveis responsáveis pelo recrutamento de células efectoras não específicas e imunes específicas. No processo inflamatório, os mesmos produzem citocinas que modulam o balanço entre a imunidade humoral mediada por linfócitos B e a mediada por células T (MARIA, 2002).

A função dos polimorfonucleares na resposta imunológica anti-tumoral está ligada basicamente à modulação da atividade citotóxica mediada por células dependentes de anticorpos e à indução da apoptose pela interação entre Fas-FasL na superfície da célula tumoral.

Em geral existem dois tipos de respostas específicas anti-tumorais, uma dependente de anticorpos e a outra mediada por células T efectoras. Os anticorpos medeiam mecanismos da citotoxicidade dependente de anticorpo, ou de complemento, ou são responsáveis pela opsonização de células tumorais alvo. Esses mecanismos dependem da habilidade do sistema imunológico em produzir anticorpos para antígenos da superfície das células tumorais que neste caso não tenham sido apresentados aos receptores do MHC de classe I.

O reconhecimento antigênico é diferente entre as células B e as células T. As primeiras podem reconhecer antígenos sem a necessidade da apresentação de outras moléculas, enquanto as últimas geralmente reconhecem antígenos necessitando receptores de células T para reconhecer complexos moleculares de MHC (complexo maior de histocompatibilidade) .

Os linfócitos exercem um papel central providenciando a especificidade do reconhecimento imune. Inúmeros trabalhos ao longo dos anos estabeleceram que a imunidade celular – aquela exercida pelos linfócitos T – é particularmente relevante para a imunologia tumoral (JANEWAW et al., 2002; DIEFENBACH et al., 2002).

Foi demonstrado que células T são capazes de especificamente lisar células tumorais autólogas in vitro (ITOH et al., 1988; TOPALIAN et al., 1989). Elas secretam também citocinas, como interleucina-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ), fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e também proliferam em resposta a estimulação com células tumorais autólogas (BARTH et al., 1991; TOES et al., 1999). Há, portanto, antígenos tumorais que são alvo de anticorpos, e antígenos tumorais que são alvos de células T.

A apresentação dos antígenos tumorais às células T é feita por meio dos MHC-I (complexo maior de histocompatibilidade tipo 1) ou MHC-II (complexo maior de histocompatibilidade tipo 2), que são moléculas receptoras de

antígenos (BJORKMAN et al., 1987; BJORKMAN et al., 1987b; RAMMENSEE, 1993). MHC-I apresentam peptídeos antigênicos aos linfócitos CD8+; MHC-II fazem a mesma função para os linfócitos T CD4+. Os linfócitos T CD8+ são por vezes chamados de linfócitos T citotóxicos (CTLs), pois uma subpopulação destas células pode lisar as células-alvo tanto liberando grânulos líticos como estimulando receptores da morte celular, como os receptores Fas, nas células alvo. Já as células T CD4+ são chamadas de células T auxiliaadoras, pois comumente aumentam a resposta imune promovendo a ativação de células B, outras células T e outras células importantes do sistema imune, como as células dendríticas (DCs) e macrófagos.

Os peptídeos antigênicos que formam complexo com MHC-I e MHC-II podem ter origem de proteínas do citossol, bem como de glicoproteínas da membrana ou extracelulares. Os primeiros são apresentados geralmente por MHC-I e os últimos pelos MHC-II.

A resposta das células T ativadas é dependente do estímulo feito pelos antígenos, e a eliminação dos antígenos ativadores geralmente resulta em morte por apoptose das células T correspondentes, exceto por poucas remanescentes que se tornam células de memória (RATHMEL et al., 1998; VAN PARIJS et al., 1998; GOLDRATH et al., 1999; RATHMELL et al., 2002).

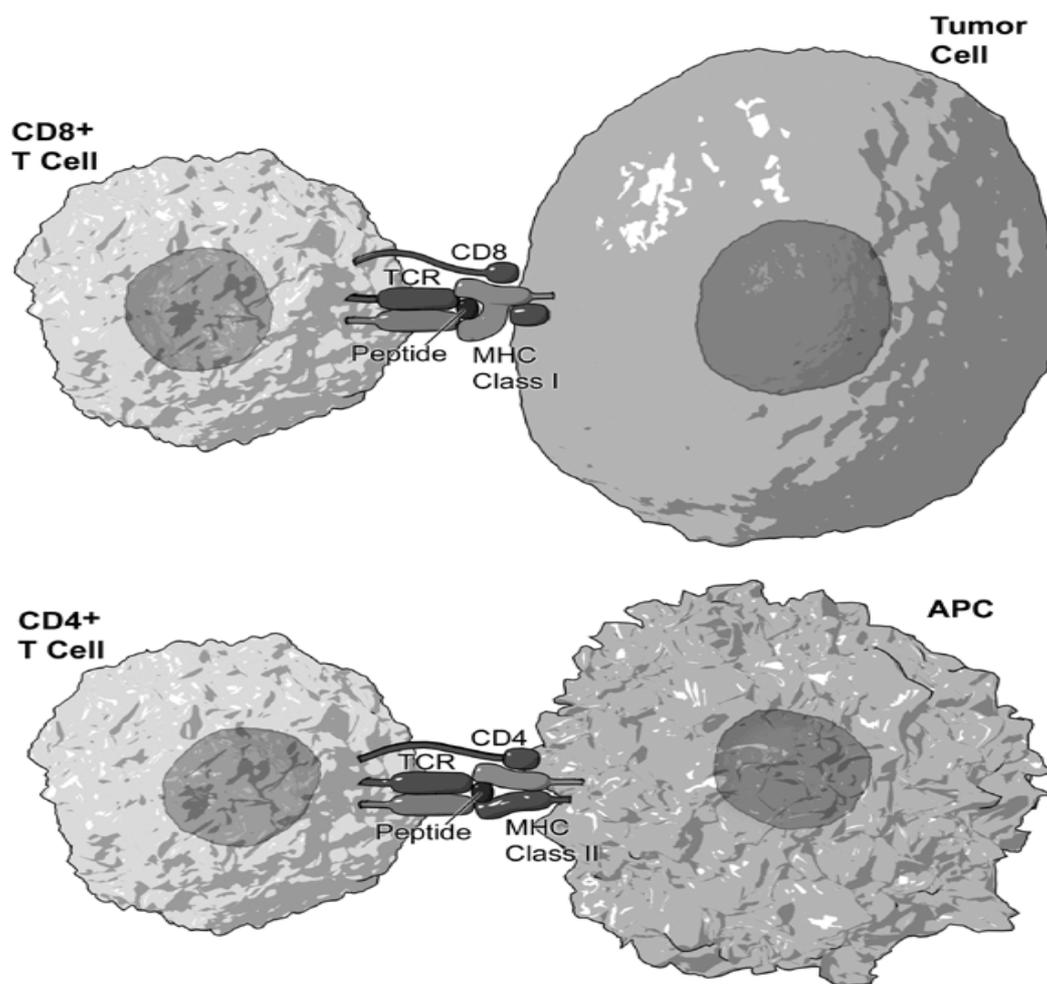
A migração das células T efetoras para os tecidos como parede gastrointestinal, pele ou sítios de inflamação é estimulada por citocinas quimiotáticas que se ligam a determinantes específicos na parede endotelial, como a proteína inflamatória macrofágica 1- β , que se liga a proteoglicanos selecionados no endotélio e promovem a adesão das células T, particularmente células T CD8+ (TANAKA et al., 1993).

3.4.2 Funções das Células T Antitumorais Maduras

As células T CD4+, ativadas por células apresentadoras de antígenos,

podem prover IL-2, outras citocinas, ou estimular a adesão de linfócitos T citotóxicos à célula apresentadora de antígeno.

FIGURA 2 – MODELO PARA ESTIMULAÇÃO DE IMUNIDADE ANTITUMORAL DE CÉLULA T CD4+ E CD8+, BASEADO NAS CÉLULAS T CD8+ INTERAGINDO COM CÉLULAS TUMORAIS E CÉLULAS T CD4+ INTERAGINDO COM CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS (APCs). (ILUSTRAÇÃO DE EMILY GREEN SHAW; RETIRADO DE DEVITA et al., 2005)



LEGENDA: CD8+ = CÉLULAS T CITOTÓXICAS; CD4+ = CÉLULAS T AUXILIADORAS; TUMOR CELL = CÉLULA TUMORAL; T CELL = CÉLULA T OU LINFÓCITO T; APC = CÉLULA APRESENTADORA DE ANTÍGENOS; TCR = RECEPTOR DE CÉLULA T; MHC Class I = COMPLEXO MAIOR DE HISTOCOMPATIBILIDADE DO TIPO I; MHC Class II = COMPLEXO MAIOR DE HISTOCOMPATIBILIDADE DO TIPO II; PEPTIDE = PEPTÍDEO; CD8 = GRUPO DE DIFERENCIAÇÃO 8; CD4 = GRUPO DE DIFERENCIAÇÃO 4

As células T auxiliaadoras foram subdivididas em dois grupos de células,

Th1 e Th2, com base no padrão de citocinas que elas secretam ao serem estimuladas (FITCH et al., 1993; SEDER et al., 1994; SEDER et al., 1999; ROMAGNANI et al., 1994; CARTER et al., 1997; CONSTANT et al., 1997; O'GARRA, 1998; ABBAS et al., 1996). Um grupo promove a resposta imune celular (Th1) e o outro a resposta imune humoral (Th2). Em modelos humanos IFN- γ é secretado por células Th1, enquanto IL-4, IL-5 e IL-9 são secretados por células Th2.

Há as células T regulatórias que são capazes de inibir as atividades de outras células, incluindo células T CD4+ e CD8+. A subpopulação de células T regulatórias têm um fenótipo CD4+CD25+. Elas podem inibir a resposta antitumoral, e a sua depleção é uma linha promissora de imunoterapia anti-câncer (SCHWARTZ et al., 2003).

Os principais tipos de células efetoras antitumorais são os linfócitos T citotóxicos e linfócitos *natural killer* (NK). A maioria dos linfócitos T citotóxicos humanos são células T efectoras CD8+ ativadas, e a maioria dos antígenos tumorais humanos são apresentados por MHC-I (ROBBINS et al., 2000; RENKVIST et al., 2001). Os linfócitos T citotóxicos parecem usar dois diferentes meios para destruir as células-alvo durante reações citolíticas que ocorrem em poucas horas. Estas incluem grânulos de exocitose e estimulação de receptores das células-alvo por ligantes relacionados a TNF, como o ligante FAS e o indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) (HENKART et al., 2003; RUSSELL et al., 2002).

Um FAS ligante (FAS-L), que é uma proteína transmembrana pertencente à família TNF, tem sido identificado na superfície dos linfócitos T citotóxicos ativados, particularmente entre as células T CD8+ e CD4+Th1.

As células NK são um grupo de linfócitos distintos dos T e B, geralmente grandes e granulares, originários da medula óssea, que tem progenitor comum com as células T, mas não requerem maturação tímica, e não expressam – diferentemente dos linfócitos T – o complexo TCR / CD3 (SPITS et al., 1995).

Representam o maior grupo de atividade citotóxica antitumoral mediada por células que não é ativado por reconhecimento antígeno-específico. Fazem parte dos mecanismos de defesa inatos, ou de linha de frente, pois para agir não requerem adaptação antígeno-específica do hospedeiro ou imunização. Não apresentam resposta de memória. Seu mecanismo de citotoxicidade parece ser similar ao dos linfócitos T citotóxicos (CD8+) (YAGITA et al., 1992; LANIER et al., 1992; SHI et al., 1992).

O sistema imune desenvolveu um mecanismo altamente complexo, regulado, e adaptativo para distinguir entre células estranhas e células autólogas normais e para reagir contra as células estranhas. Células tumorais que são sensíveis ao sistema imune adaptativo são reconhecidas e destruídas primeiramente por resposta imune celular. Estas respostas dependem dos receptores de células T clonalmente distribuídos para reconhecimento específico dos antígenos da superfície da célula tumoral e pelo disparo das atividades das células T que matam as células tumorais tanto diretamente como por recrutamento de outras células do hospedeiro.

Células T que matam diretamente as células tumorais são comumente as CD8+ e geralmente reconhecem antígenos tumorais como complexos de MHC-I e peptídeos antigênicos da superfície celular derivados primariamente do processamento de proteínas intracelularmente nas células tumorais. As células T que ajudam as respostas imunes contra tumores são comumente CD4+ e geralmente reconhecem complexos de MHC-II / peptídeos antigênicos na superfície celular. Como os precursores para células T maduras CD8+ citotóxicas, os precursores das células T CD4+ auxiliadoras são ativados primeiramente por células apresentadoras de antígenos do hospedeiro, particularmente células dendríticas, linfócitos B ativados, e macrófagos ativados. Estes três tipos de células apresentadoras de antígenos podem processar proteínas tumorais adquiridas por endocitose. Células dendríticas ativadas, porém, parecem ser as únicas a serem capazes de ativar as células T

pela primeira vez contra antígenos tumorais após deixarem o timo como células T maduras mas nativas.

Para estimular os linfócitos T, particularmente células T nativas, em um modo antígeno-específico, comumente são requeridos dois diferentes sinais da superfície celular. O primeiro sinal é do antígeno tumoral, que seleciona a célula T para responder e providencia especificidade como resultado do mecanismo de estimulação do receptor antígeno-específico TCR na superfície da célula T. O segundo sinal é um sinal coestimulatório essencial (mas por si só insuficiente) das células apresentadoras de antígenos, que reduz a probabilidade de resposta de célula T insuficiente. A resposta imune é promovida ou limitada por células regulatórias através de suas citocinas secretadas e ligantes de superfície celular, que, como um grupo, formam uma rede de atividades que reduzem a probabilidade de falha geral da resposta imune ou de uma resposta imune deficitária.

Células T podem reconhecer auto-antígenos e não-auto-antígenos. Não-auto-antígenos tumorais são principalmente derivados de proteínas que tem uma estrutura anormal proveniente de instabilidade genética tumoral, ou proteínas que são produtos de genes virais de dentro do tumor, ou proteínas que não são produzidas em células normais em um nível imunogênico inicial. Os TCRs de células T maduras que reagem com estes antígenos comumente fazem com uma alta afinidade. Em contraste, muitas proteínas tumorais são auto-proteínas compartilhadas com células normais, e células T com alta afinidade para estes peptídeos antigênicos parecem ser grandemente eliminadas durante a sua maturação no timo. Estimular uma resposta imune contra estes antígenos é difícil e geralmente requer quebra de tolerância. Além da eliminação das células T no timo, uma variedade de mecanismos fora do timo previnem resposta imune celular contra auto-antígenos. Ativação antígeno-específica de células T naive é limitada primariamente a peptídeos antigênicos apresentados por células dendríticas ativadas e esta células

geralmente funcionam em locais onde inflamação e um tipo de antígeno estão presentes. Deleção ou anergia é um fato comum às células T nativas que respondem a antígeno na ausência de sinais coestimulatórios. Células T regulatórias podem bloquear a proliferação e função das células T antitumorais (DEVITA et al., 2004).

As células tumorais podem escapar do reconhecimento antígeno-específico por diferentes mecanismos, que geralmente refletem instabilidade genética (MARINCOLA et al., 2000; GARCIA-LORA et al., 2003; CAMPOLI et al., 2002; KHONG et al., 2002).

Os mecanismos imunológicos específicos e não específicos interagem nas respostas contra o aparecimento e desenvolvimento de várias neoplasias cutâneas. O infiltrado inflamatório produz um ambiente propício para a ativação da resposta imunológica específica, levando ao influxo de outros elementos celulares, como os macrófagos e linfócitos efetores, e ativando os mecanismos de apresentação dos antígenos tumorais.

Os anticorpos monoclonais podem ser gerados em laboratório e podem ser utilizados para combater antígenos tumorais nos pacientes com tumores que apresentam antígenos sensíveis a eles, como cânceres de células B (ex. anti-CD20 e anti-CD-25) (WALDMAN et al., 2000; PRESS et al., 2001). Estão ainda sendo criados antígenos para prevenir o câncer ao invés de tratá-lo, como por exemplo, a vacinação precoce para hepatite B prevenindo o carcinoma hepatocelular, e os programas de vacinação contra o papilomavírus humano (HPV), prevenindo o carcinoma de colo de útero (KOUTSKY et al., 2002). Os avanços nos estudos de imunologia tumoral e de genômica e proteômica tumoral estão aumentando o conhecimento da natureza das alterações de DNA, RNA-m e proteínas que resultam em potenciais antígenos para células T (STRAUSBERG et al., 2003; HANASH, 2003).

Nos melanomas a reatividade tumoral de célula T mais comumente encontrada é contra o antígeno de melanoma reconhecido por células T

(MART-1 / Melan-A), que é uma proteína de diferenciação de melanócitos, produzida por eles (ROSENBERG, 1999). O MART-1 é expresso em melanócitos normais, nevos benignos e melanomas; sendo assim, não é útil na distinção entre lesões melanocíticas (MANGINI et al., 2002).

Há marcadores específicos baseados na reatividade a anticorpos, que foram identificados e permitem detectar células T individuais, com um particular estágio de maturação (ZOLA et al., 2006). Os marcadores são moléculas de superfície celular. Por exemplo, o complexo TCR/CD3 é agora comumente utilizado como marcador de células T.

3.5 INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL (TIL) NO MELANOMA

3.5.1 Conceitos e Fisiopatogenia do TIL

Os conceitos originais concernentes ao TIL surgiram de observações de regressão de melanomas malignos, raramente completamente, usualmente parcialmente, mediada por linfócitos. Além disso, a observação de nevo halo, um fenômeno invariavelmente associado com regressão de um nevo, bem como a mediação dos linfócitos no processo de regressão, certamente estabeleceu uma importância para os linfócitos em causar destruição melanocítica e, subsequente, desaparecimento das lesões pigmentares afetadas. Dr. Wallace Clark utilizou, em uma discussão sobre um caso de regressão de melanoma, o termo “tumor infiltrating lymphocytes” (TIL), em 1967, sendo a primeira vez que esta designação foi utilizada (MIHM, 1999).

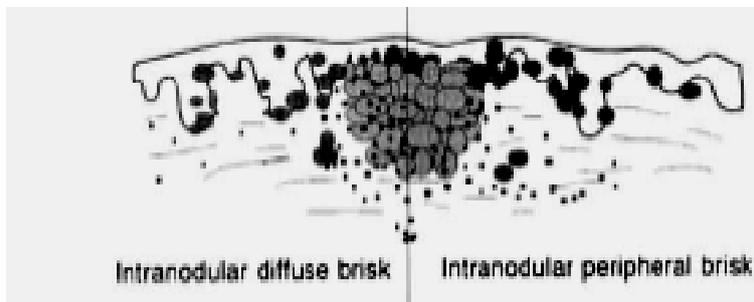
Já em 1978, LARSEN e cols., num estudo histológico retrospectivo de 669 casos de melanoma cutâneo primário estágio clínico I, verificaram uma relação altamente significativa entre um infiltrado linfocitário denso e uma invasão tumoral até a interface papilar-reticular, em contraste com uma resposta pobre associada com invasão mais profunda. Para um mesmo nível

de invasão não houve diferença no prognóstico em relação à densidade da infiltração linfocitária (LARSEN et al., 1978).

Nos anos 80 houve vários estudos relacionando a resposta imune com o prognóstico do melanoma (MIHM, 2006).

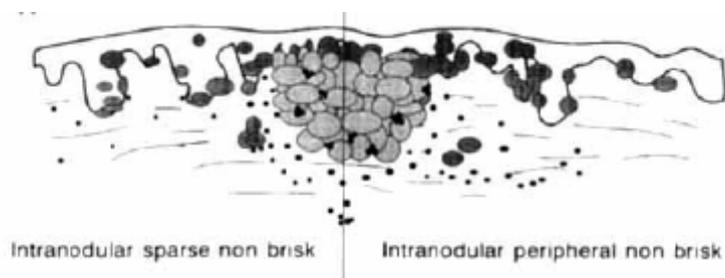
No início, os estudos sobre TIL foram muito contraditórios, talvez pela comparação desta infiltração em diferentes fases do melanoma. De acordo com ELDER et al (1985), para os linfócitos serem de importância prognóstica, devem penetrar na fase de crescimento vertical e desalinhar as células do melanoma. Em uma tentativa de verificar a competência da presença da infiltração linfocitária tumoral como um fator prognóstico histopatológico independente, CLEMENTE et al. (1996) avaliaram 285 casos consecutivos de melanoma cutâneo com fase de crescimento vertical. O infiltrado linfocitário tumoral foi classificado, de acordo com ELDER et al. (1985) e CLARK et al. (1986), em três categorias: *brisk*, *nonbrisk* ou *absent*. Como já definido anteriormente, *brisk* se os linfócitos estão presentes difusamente pela fase de crescimento vertical; *nonbrisk* quando os linfócitos se encontram em um ou mais focos da fase de crescimento vertical do melanoma cutâneo; *absent* se não há linfócitos presentes, ou são presentes mas não infiltram o melanoma (Figuras 3, 4 e 5). Do total de casos, 69 eram de melanomas com um máximo diâmetro menor que 6,0mm e 85,5% dos quais com espessura menor que 2,0mm. A diferença de sobrevida em 7 anos, entre os casos em que a infiltração foi *brisk* (100%), *nonbrisk* (77%) e *absent* (45%) sugeriu que a presença do TIL é um importante fator prognóstico independente do tamanho e espessura da lesão.

FIGURA 3 - INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL (TIL) "BRISK" (CLEMENTE et al., 1996)



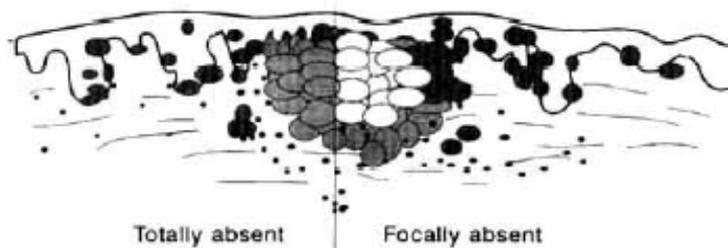
LEGENDA: ● = FASE DE CRESCIMENTO RADIAL; ● = FASE DE CRESCIMENTO VERTICAL; ■ = LINFÓCITO; INTRANODULAR DIFFUSE BRISK= BRISK INTRANODULAR DIFUSO; INTRANODULAR PERIPHERAL BRISK= BRISK INTRANODULAR PERIFÉRICO.

FIGURA 4 - INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL (TIL) "NONBRISK" (CLEMENTE et al., 1996)



LEGENDA: ● = FASE DE CRESCIMENTO RADIAL; ○ = FASE DE CRESCIMENTO VERTICAL; ■ = LINFÓCITO; INTRANODULAR SPARSE *NONBRISK* = NÃO *BRISK* INTRANODULAR ESCASSO; INTRANODULAR PERIPHERAL *NONBRISK* = NÃO *BRISK* INTRANODULAR PERIFÉRICO.

FIGURA 5 - INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL (TIL) "ABSENT" (CLEMENTE et al., 1996)



LEGENDA: ● = FASE DE CRESCIMENTO RADIAL; ○ = FASE DE CRESCIMENTO VERTICAL; ■ = LINFÓCITO; ○ = CLONE DIFERENTE DE CÉLULAS DE MELANOMA; TOTALLY ABSENT= TOTALMENTE AUSENTE; FOCALLY ABSENT= FOCALMENTE AUSENTE

Com o propósito de avaliar o nível de dificuldade da mensuração do TIL, um grupo de pesquisadores do departamento de Patologia do Memorial Sloan Kettering Cancer Center estudou a concordância entre observadores na categorização desta infiltração (BUSAM et al., 2001); 20 casos de melanoma maligno cutâneo primário em fase de crescimento vertical foram circulados entre 3 patologistas e 3 dermatologistas. Para cada caso, o TIL foi classificada como *brisk*, *nonbrisk* ou *absent* de acordo com Clark. Somente um patologista (um dermatopatologista) era familiar com a classificação de TIL. Aos observadores foi dado linhas de conduta escritas e um breve tutorial antes que fizessem o exame de suas lâminas. Os resultados encontrados mostraram que com pequena instrução, uma concordância generalizada entre observadores foi boa (com valores kappa de 0,6 ou mais), especialmente entre patologistas (kappa >0,7). Três observadores tiveram excelente concordância entre si (kappa>0,75). Os achados sugerem que a categorização do TIL é viável e pode ser aplicada com um nível aceitável de reprodutibilidade na prática diagnóstica de rotina.

Segundo CLARK et al. (1989), tendo fixos todas as outras variáveis, a

presença de um TIL *brisk* confere ao paciente uma probabilidade de sobrevivência 11 vezes maior que nos casos com TIL *absent*, ou mesmo do TIL que não está em contato com as células neoplásicas.

Já a correlação entre reação inflamatória e melanoma cutâneo não foi observada em uma série de 43 pacientes com melanoma de espessura delgada (menores que 1 mm) e que desenvolveram metástases, publicada por GUITARD et al. (2002).

Estudo recente de um grupo húngaro comparou o infiltrado linfocitário tanto intratumoral como peritumoral de 76 melanomas cutâneos operados entre 1980 e 2000 no Instituto Nacional de Oncologia de Budapeste, de maneira quantitativa e qualitativa, tendo como resultado a evidência que no grupo estudado houve correlação positiva entre infiltrado linfocitário peritumoral e melhor prognóstico, bem como houve correlação positiva entre dois marcadores de ativação de linfócitos T, o CD25+ e o OX40+, com uma melhor evolução dos pacientes estudados (LADÁNYI et al., 2004).

Já em relação à presença de infiltrado linfocitário tumoral em linfonodos metastáticos, que foram o primeiro sítio de recorrência em 99 pacientes revisados por MIHM et al. (1996), 16 foram classificados como *brisk* (reação linfocitária intensa), 37 como *nonbrisk* (reação linfocitária moderada) e 46 como *absent* (reação linfocitária ausente). Em 30 meses de follow-up a sobrevida livre de doença foi de 81,3% nos casos *brisk*, 46,8% nos casos *non-brisk*, e 29,3% nos casos *absent*. A análise multivariada confirmou o valor prognóstico do TIL em prever sobrevida livre de doença nos pacientes com metástases linfonodais.

Ainda para estabelecer valor prognóstico das células do sistema imune que infiltram o melanoma, PIRAS et al. (2005) avaliaram a distribuição e densidade de subtipos de linfócitos T, macrófagos e células dendríticas em amostras de melanoma cutâneo primário de 47 pacientes com melanoma estágio I e II de acordo com o sistema de estadiamento da AJCC. Realizaram

uma avaliação quantitativa de células CD8, CD4, CD68 e HLA-DR em áreas selecionadas da base do melanoma em fase de crescimento vertical. Quando possível, estas células foram contadas e os valores médios foram correlacionados com sobrevida em uma análise estatística. O diagnóstico de melanoma das lesões foi morfológico e fenotípico, analisando presença de antígenos associados ao melanoma, como proteína S-100, melan A e HMB-45. Foram contadas as infiltrações linfocitárias tumorais por células CD8+ na base da fase de crescimento vertical dos melanomas, perto da derme, e classificados os tumores em grupos de alto, moderados e baixo nível de linfócitos. É interessante notar que houve uma diferença significativa de sobrevida em 5 anos entre os indivíduos dos grupos de alta (78,8% de sobrevida), moderada (44,4% de sobrevida) e baixa (25% de sobrevida) densidade de linfócitos T CD8 nas séries de melanoma, sem qualquer relação com outras variáveis clínicas. Estes achados implicariam que a presença de infiltração linfocitária por linfócitos CD8+ pode ser um importante fator prognóstico independente. A presença de mais de 100 linfócitos CD8 aumentaria a taxa de sobrevida significativamente e levaria a um melhor prognóstico, confirmando a atividade antitumoral dos linfócitos T no melanoma. Estes achados confirmaram o trabalho de CLARK et al. (1989), que identificaram o significado do TIL no prognóstico de indivíduos com melanoma pela primeira vez em 1989 e foram muito similares aqueles publicados por CLEMENTE et al. (1996) em termos de sobrevida em 5 anos entre as categorias de infiltração *brisk*, *nonbrisk* e *absent*. Além disso, TUTHILL et al. (2002) evidenciaram que uma resposta do TIL em pacientes com melanoma, quando na forma *brisk*, era muito protetora em relação à sobrevida. A colocalização dos linfócitos T CD4 com os linfócitos CD8 foi encontrada nas lesões, porém os linfócitos CD4 foram encontrados menos freqüentemente que os CD8. Porém, aqueles não foram contados, pois seu antígeno era comum para ambos linfócitos e macrófagos; por isso, a contagem de células de CD4

não pode se constituir em um método válido para avaliar estas células como parâmetro prognóstico. Os linfócitos CD4 reconhecem os antígenos em associação com moléculas HLA II que são expressadas por linfócitos B ativados, macrófagos e células dendríticas, que contatam com antígenos tumorais pela sua fagocitose, processamento e ativação das células T auxiliaadoras. A presença e densidade das células apresentadoras de antígenos foi avaliada pelo antígeno HLA-DR, e sua ocorrência global foi correlacionada significativamente com a sobrevida.

Hipotetizando que há um aumento do TIL com a evolução da melanomagenese, no sentido de um nevo benigno, passando por nevo displásico, melanoma com fase de crescimento radial e melanoma com fase de crescimento vertical, HUSSEIN et al. (2006) estudaram 74 lesões melanocíticas, compostas por 12 nevos benignos, 12 nevos displásicos, 13 melanomas cutâneos em fase de crescimento radial, 26 melanomas cutâneos em fase de crescimento vertical e 11 melanomas metastáticos. Após o diagnóstico histológico convencional das lesões, fizeram uma análise do infiltrado linfocitário com imunohistoquímica utilizando anticorpos para antígeno leucocitário comum (LCA+), linfócitos T (CD3+), linfócitos B (CD20+) e células T citotóxicas em repouso (TIA-1+). O controle positivo dos espécimes era constituído de linfonodos com hiperplasia linfóide reativa (LCA, CD3, CD20 E TIA-1). Cortes adicionais, correndo em paralelo mas com omissão do anticorpo primário serviram como controle negativo. Nos resultados obtiveram um aumento gradual no número dos TILs no sentido da pele normal para o melanoma cutâneo em fase de crescimento vertical. Além disso, estes aumentos eram associados com aumentos similares dos TILs no parênquima, estroma, base, áreas perivasculares e epiderme destas lesões. Porém, houve significância estatística nestes aumentos quando comparados os valores do melanoma com dos nevos benignos, mas não dos nevos displásicos com os nevos benignos, nem comparando os melanomas em fase de crescimento

radial com os nevos displásicos. Ocorreu também um aumento gradual nos valores da coloração para LCA+, CD20+, CD3+ e linfócitos TIA-1+ durante a transição de pele normal para nevo benigno, nevo displásico, melanoma em fase de crescimento radial, melanoma em fase de crescimento vertical. Este aumento foi tanto na intensidade da coloração, porcentagem de células positivas e escore de imunoreatividade ($p < 0.01$). A maioria das infiltrações era constituída mais por células T que por células B. Análise imunohistoquímica da porcentagem de células positivas revelou que a infiltração linfocitária tumoral era predominantemente CD3+ (linhagem de células T), com poucas células CD20+ (linhagem de células B). Comparada com a infiltração no parênquima, a infiltração estromal (a soma da infiltração linfocitária tumoral do estroma com as áreas basais, margens e perivasculares) foi mais densa em todas as lesões melanocíticas cutâneas. A maioria das células CD3+ eram TIA-1+ com potencial citotóxico. Quando a porcentagem de células CD3+ e TIA-1+ era comparada, a maioria era composta por células TIA-1+. As células TIA-1+ representaram 48%, 53,3%, 70% e 75,6% do total do TIL em nevos benignos, nevos displásicos, melanomas em fase de crescimento radial e melanomas em fase de crescimento vertical, respectivamente. Na população de melanomas metastáticos avaliada, percebeu-se uma diminuição no TIL quando comparados com os melanomas primários, tanto em fase radial como em fase vertical de crescimento. A associação entre TIL e fatores clínico-patológicos selecionados (metástases, recorrência, tamanho, localização e tipo histológico) foi examinada e testada para significância estatística. Não houve correlações significativas entre estes fatores e o TIL.

O aumento gradual no TIL com a transição de pele normal, nevo benigno, nevo displásico, melanoma em fase de crescimento radial até o melanoma em fase de crescimento vertical poderia se explicado por três possibilidades. Primeiramente, estas transições estariam associadas com aumento de imunogenicidade das células lesionais, que poderia induzir

ativação e proliferação local das células imunológicas. A imunogenicidade das células do melanoma é atribuída à existência de vários auto-antígenos chamados antígenos do melanoma (MART-1, gp-100, gp75 e tirosinase). O nível destes antígenos tem um impacto importante no estado de ativação da infiltração linfocitária. Segundo, é possível que este aumento no TIL durante melanomagenese pode ser devido à carga de antígenos associados nas células tumorais. Estes antígenos podem ser antígenos de câncer de testículo ou mutações genéticas como p53 (supressor tumoral) ou Ras (oncogene). Estes antígenos podem induzir ativação local e proliferação dos imunócitos (LUFTL et al., 2004; PRASAD et al., 2004; DOS SANTOS et al., 2000). Terceiro, o aumento no TIL nestas transições cutâneas pode refletir um aumento de produção de citocinas pelas células tumorais – isto é, as células de nevo displásico e de melanoma podem produzir mais citocinas e quimiocinas que as células do nevo benigno. As células de melanoma recrutam ainda mais células imunológicas (VICARI et al., 2002). A presença de linfócitos T e B nas lesões melanocíticas do estudo de HUSSEIN e cols não somente vai em concordância a estudos prévios (FRISCH et al., 2000; PEREZ et al., 2002; BARBOUR et al., 2003), mas também sugere o envolvimento de imunidade celular e humoral na melanomagenese. A maioria do TIL eram células T CD3+, o que reflete aumento na proliferação de células T. O anticorpo monoclonal CD3 utilizado é considerado um pan-marcador de células T. Além disso, a presença de um grande número de linfócitos CD3+ em áreas onde as células tumorais eram esparsas, com um baixo número de linfócitos CD3+ em áreas onde as células tumorais eram abundantes vai de acordo com resultados já relatados na literatura (FRISCH et al., 2000; TEFANY et al., 1991). Conjuntamente, estes resultados sugerem que os linfócitos T têm um papel importante na defesa imune contra o melanoma.

O anticorpo monoclonal CD20 utilizado no estudo de HUSSEIN et al. (2006) era um pan-marcador de células B. O baixo número de células B CD20+

localizadas nas lesões melanocíticas foi consistente com o encontrado em modelos animais (PEREZ et al., 2002). Estes achados sugeriram que a resposta local de anticorpos não tem papel muito importante na defesa imune contra o melanoma.

Vários estudos sugerem ramificações terapêuticas e prognósticas para o TIL em melanoma (ABBOTT et al., 2004). No melanoma, as células tumorais, no estroma ao seu redor bem como na epiderme adjacente, são infiltradas por vários tipos de linfócitos; a maioria células T citotóxicas - CTL. O TIL é responsável pela destruição das células tumorais e regressão nesta neoplasia. Estas características são sustentadas por vários achados experimentais: (a) a transferência de um grande número de infiltração linfocitária pode mediar rejeição tumoral em modelos animais (WIZNEROWICZ et al., 1997), (b) o número de infiltrado linfocitário e secreção de citocinas são críticos para regressão do melanoma induzida por célula T (ARUGA et al., 1995) e (c) a presença de infiltração linfocitária, é um poderoso preditor de sobrevida em melanomas (COLE et al., 1994). Em melanoma, a imunidade celular tem um papel determinante. A essência deste papel reside na integridade dos subtipos de células T incluindo ambos linfócitos T citotóxicos e linfócitos T auxiliares. Os linfócitos T citotóxicos são caracterizados por presença de grânulos citoplasmáticos citotóxicos como antígeno intracelular restrito à célula (TIA-1). Alternativamente, as células CD4 podem produzir diversas citocinas (KANG et al., 1995). Até hoje, a caracterização imunofenotípica do TIL em todo o espectro das lesões de pele melanocíticas é ainda incompleta.

A evidência da diminuição da infiltração linfocitária nos melanomas metastáticos em linfonodos em comparação com os melanomas primários pode ter várias explicações: (a) diminuição da densidade de células dendríticas nos linfonodos afetados, (b) decréscimo dos marcadores de ativação inicial linfocitária receptor de interleucina-2- α (IL-2R) e CD69, e (c) decréscimo ou perda da expressão da IL-2 pelo TIL. O desenvolvimento de doença

metastática apesar da intensa presença de células imunes nos linfonodos pode ser explicada por diversas possibilidades: 1) apesar das células imunes estarem acumuladas nos tecidos nodais, elas seriam anérgicas ou senescentes e por isso não podem lisar as células tumorais, 2) as células imunes poderiam ter diversas funções no microambiente do linfonodo, de modo que seria permitido o crescimento tumoral, 3) as células de melanoma metastático poderiam perder suas moléculas de HLA, 4) irresponsividade da célula T devido ao decréscimo do complexo receptor de célula T cadeia zeta (TCR/CD3+), e 5) as células de melanoma poderiam secretar citocinas (IL-10) que suprimiria a resposta imune (MATSUDA et al., 1995).

3.5.2 Aspectos Moleculares e Imunomarcção do TIL

A progressão do melanoma humano é associado com mudanças no fenótipo antigênico das células tumorais. BROCKER e col. estudaram 146 melanomas cutâneos em diferentes estágios de progressão, para estabelecer quando o infiltrado inflamatório no melanoma em progressão também muda. Foram aplicados *in situ* anticorpos monoclonais contra subpopulações de linfócitos e macrófagos, receptor de IL-2, IFN- γ , antígenos de progressão associados ao melanoma HLA-DR e gp89. Durante o curso da progressão do melanoma, quantidades decrescente de células T peritumorais, linfócitos exprimindo receptores de IL-2 e células dendríticas foram encontradas, enquanto crescente número de células T intratumorais e macrófagos foram associados com progressão local de melanomas primários. Nas metástases, a presença da maioria dos componentes do infiltrado foi rara. Correlações positivas foram observadas entre: células T6+ dérmicas e linfócitos IL-2R+, e presença de IFN- γ no infiltrado e HLA-DR e gp89 antígenos nas células tumorais. Em todos estágios, a expressão do HLA-DR nas células tumorais foi correlacionada com um deslocamento dos linfócitos T8+ no infiltrado e perda

da expressão do receptor de IL-2. Os dados obtidos sugeriram influência mútua entre células de melanoma e infiltrado celular mononuclear *in situ* (BROCKER et al., 1988).

PIERARD-FRANCHIMONT et al. (1998), objetivando determinar quando a imunoreatividade dos antígenos de diferenciação dos melanócitos (MDA) está associada com aumento do TIL, fizeram um estudo retrospectivo com 30 melanomas cutâneo que haviam desenvolvido evidência clínica de metástases após 3 anos da excisão cirúrgica do melanoma primário. Utilizaram análise imunohistoquímica e imagem computadorizada para quantificar as células MDA positivas (Melan A / MART-1, gp100 / Pmel 17 / HMB45, tirosinase), TIL CD45R0-positiva e infiltração tumoral por macrófagos (TIM) proteína LI positiva. Evidenciaram uma relação direta entre a imunoreatividade dos antígenos de diferenciação de melanócitos e as densidades em TIL e infiltração tumoral por macrófagos, e uma relação inversa entre infiltração linfocitária e macrofágica, e não encontraram padrão específico de imunoreatividade do melanoma cutâneo primário para MDA, TIL e TIM possível de prever metástases.

O TIL pode ter alterações durante a progressão do melanoma, como foi sugerido por CARCELAIN et al. (1997) no seguimento clínico de um paciente com melanoma cutâneo primário regressivo, que desenvolveu metástases em estômago e em linfonodo axilar 3 e 4 anos depois do tratamento da lesão primária. Quando da lesão primária, a análise de receptor de células T (TCR) demonstrou amplificação *in situ* de certos linfócitos. Dois destes podiam ser clonados e caracterizados como linfócitos T citotóxicos restritos a CD8+HLA-classe-I. Foram estabelecidas linhagens de células de melanoma derivadas das duas lesões metastáticas, e foi encontrado que estas células metastáticas mantiveram expressão de ambas as moléculas HLA-I e antígenos peptídicos reconhecidos pelos 2 clones amplificados no sítio primário. Porém, os linfócitos T correspondentes foram ou indetectáveis ou pobremente representados tanto

na lesão gástrica como na axilar. Estes resultados sugeriram que alterações substanciais na qualidade do TIL ocorreram durante a progressão do melanoma, apesar de uma aparente estabilidade de apresentação dos antígenos associados ao tumor, que inicialmente provocava uma resposta de rejeição positiva.

O comportamento biológico do TIL pode não ser uniforme para um mesmo melanoma. Pensando nesta hipótese, YAZDI et al. (2006) estudaram 56 melanomas cutâneos primários utilizando uma técnica de microdissecção com captura a laser para isolar diferentes classes de TIL objetivando determinar quando o melanoma primário era infiltrado somente por um simples clone ou quando os antígenos associados ao tumor poderiam atrair várias populações de células T. Como a clonalidade do receptor de células T (TCR) é um instrumento útil para demonstrar a clonalidade de células T, foram analisadas as lesões quanto a rearranjos do gene de cadeia γ TCR. Evidenciaram diferentes clones de células T em várias regiões de um mesmo melanoma primário. Seus resultados trouxeram uma nova luz no paradoxo de como pode haver grandes infiltrações linfocitárias tanto em áreas de regressão tumoral como em áreas de progressão tumoral de um mesmo melanoma maligno (THOR STRATEN et al., 2000). Como foi previamente mostrado que diferentes populações de células T têm diferentes efeitos no crescimento tumoral (EGETER et al., 2000; MOCIKAT et al., 2003), os dados obtidos por YAZDI et al. (2006) sugerem que diferentes tipos de infiltrações linfocitárias podem tanto inibir como promover o crescimento do melanoma em diferentes áreas do tumor.

As células T CD3+CD4+ têm um papel crítico na geração e manutenção de fortes respostas imunes contra antígenos associados ao melanoma. Vários antígenos expressos no melanoma contêm determinantes reconhecidos pelos linfócitos T CD4+ e CD8+. A integração destes antígenos e seus peptídeos derivados em estudos sobre vacinas permitem aumento eficaz da resposta

imune anti-melanoma das células T CD4+ e CD8+ em um cenário terapêutico. Vários estudos têm mostrado que as células CD4+ são associadas com regressão em melanoma primário e rejeição de tumores em modelos de transferência adotivos. O mecanismo pelo qual CD4+ medeiam seus efeitos anti-tumorais envolve interação Fas/Fas-ligante e secreção de várias citocinas como fator de estimulação de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e gama interferon (γ -IFN) (TAKAHASHI et al., 1995; THOMAS et al., 1998). Por outro lado, as células T citotóxicas têm sido implicadas no controle da progressão do melanoma humano. O linfócito CD3+CD8+ citotóxico é um importante efetor celular contra as células de melanoma (MARKUS et al., 1995; MORISAKI et al., 1994).

3.6 IMUNOHISTOQUÍMICA E MARCADORES PARA O MELANOMA

Como a incidência do melanoma aumenta, há uma grande preocupação em desenvolver e melhorar técnicas diagnósticas, especialmente para auxiliar no tratamento precoce levando a uma menor morbidade e mortalidade. Muitas diferentes técnicas são disponíveis ao patologista para avaliação de tumores melanocíticos. Elas incluem morfometria, avaliação da ploidia de DNA, análise cromossômica específica e análise da região de organização nucleolar. A imunohistoquímica, porém, permanece como a técnica mais comum e eficiente na patologia diagnóstica. Muitos estudos recentes apresentaram novos marcadores imunohistoquímicos bem como analisaram marcadores previamente descritos de lesões melanocíticas. MANGINI et al. (2002) revisaram os mais atuais marcadores imunohistológicos de tecido melanocítico com a intenção de categorizar e identificar os marcadores diagnósticos mais promissores para as lesões melanocíticas e envolvidos na patogênese do melanoma, entre marcadores de adesão celular, apoptose e proliferação celular. Os resultados por vezes conflitantes na literatura acreditam que sofram

influência das diferenças entre os anticorpos usados, nos métodos de recuperação antigênica, bem como nas concentrações utilizadas. Consideraram que durante os vários estágios do desenvolvimento tumoral, diferentes isoformas do mesmo antígeno podem ser expressas, podendo ou não serem detectadas com um dado anticorpo.

É bem sabido que a perda da antigenicidade em tumores mais pobremente diferenciados pode afetar a utilidade dos estudos imunohistoquímicos. Pelo fato de que mais de um fator afeta o padrão de comportamento tumoral, é impossível usar critérios rígidos baseados somente na expressão antigênica para diagnosticar lesões e prever a evolução clínica. Parâmetros clínicos e histológicos também devem ser considerados.

Os anticorpos diagnósticos mais promissores para distinguir entre lesões melanocíticas benignas e malignas parecem ser β -2 integrinas, CD44, MIB-1, ciclina D1, p16, p53 e CD26. A molécula de adesão celular Mel-CAM, mitf e Mart-1 são úteis para distinguir lesões melanocíticas das não melanocíticas quando utilizadas com um painel de anticorpos adequado. Porém, a correlação clínico-patológica permanece como o mais importante fator na avaliação diagnóstica e prognóstica do melanoma maligno.

Em uma recente revisão sobre novos biomarcadores em melanoma maligno, é feita a inferência que nenhum marcador molecular ainda se mostrou superior à classificação histológica convencional em grandes estudos e assim não encontrou seu espaço para ser utilizado na rotina do diagnóstico convencional de melanoma (BOSSERHOFF, 2006). Porém, biomarcadores para problemas definidos na análise do melanoma maligno devem ser estabelecidos. Problemas importantes são (1) a diferenciação entre nevos benignos, nevos displásicos e melanoma, (2) definição de prognóstico (pacientes de alto risco) e (3) procura da melhor opção terapêutica. Vários novos marcadores irão surgir de grandes estudos no futuro próximo (HOEK et al., 2004; BITTNER et al., 2000). Dados de tratamentos investigacionais

sugerem que certos marcadores poderão ter uma importância crucial em identificar qual doente irá responder à terapia ou mostrar utilidade em monitorar a resposta à terapia. Aqui, o diagnóstico molecular pode potencialmente ser benéfico para o portador individual de melanoma.

3.7 MICROARRANJOS TECIDUAIS (TMA) NO MELANOMA

Em 1998, Kononen et al. descreveram um mecanismo para examinar vários cortes histológicos de uma vez por seu rearranjo precisamente em um bloco de parafina. Estes microarranjos teciduais (TMA) são feitos fazendo biópsias centrais com agulha de tecidos embebidos em parafina pré-existentes, e recolocando-os em um “bloco mestre”. Deste modo, tecidos de centenas de espécimes podem ser representados em um simples bloco de parafina, propiciando um procedimento de alta capacidade para determinar o perfil molecular dos tecidos dos espécimes usando várias técnicas, incluindo imunohistoquímica. Uma vantagem futura é que todos os espécimes são processados ao mesmo tempo usando condições idênticas. Isto também reduz acentuadamente a quantidade de tecido arquivado requerido para um estudo em particular, preservando assim amplo tecido remanescente para outra pesquisa ou necessidade diagnóstica (MILLS et al., 1995).

Sugere-se fortemente que tumores com proeminente heterogeneidade intratumoral necessitam verificação dos dados gerados por análise de microarranjo tecidual (KONONEN et al., 1998). As relações entre os dados imunohistoquímicos derivados de microarranjos teciduais e aqueles da imunohistoquímica tradicional por cortes completos ainda não foi claramente determinada para todos os tumores. Existe poucos dados na literatura para validar os microarranjos teciduais para o melanoma.

O número de biópsias teciduais por espécime tumoral requerido no arranjo para reduzir a taxa de erro atribuída à heterogeneidade tecidual e para

manter um processamento eficiente do tecido já foi previamente determinado para vários tumores, incluindo carcinoma de mama (CAMP et al., 2000) e tumores humanos fibroblásticos (HOOS et al., 2001). O uso de um alto número de amostras por tumor resulta em um menor número de casos perdidos e menor discordância com cortes completos comparados com o uso de uma ou duas amostras. A maioria das colorações imunohistoquímicas padrão resultam em leituras que distinguem entre categorias positivas e negativas, enquanto outras têm um grau maior de complexidade requerendo diferenciação para serem feitas na intensidade da coloração.

A molécula de adesão celular ao melanoma (MCAM) é uma molécula de adesão heterofílica célula-célula a que é atribuída importância na progressão tumoral (SHIH, 1999). É fortemente expressa na maioria dos melanomas cutâneos humanos mas não nos melanócitos epidermais (LEHMANN et al., 1989), e pode ser corada usando técnicas imunohistoquímicas (SHIH et al., 1998). Em um esforço para validar o uso dos microarranjos teciduais na investigação imunohistoquímica para o melanoma, PACIFICO et al. (2004) conduziram um estudo que definiu uma concordância de biópsias amostradas a 0,6mm em quadruplicar arranjos teciduais comparadas com análise de secção completa para a expressão e intensidade da MCAM. Houve uma concordância de 96,6% quando a expressão da MCAM isolada foi estudada, mostrando uma alta correlação entre as análises imunohistoquímicas provenientes de microarranjos teciduais e as análises usando técnicas tradicionais. Os resultados deste estudo validaram o uso dos microarranjos teciduais para estudo imunohistoquímico do melanoma. Os autores sugerem o uso de quatro amostras para cada espécime de melanoma para reduzir a chance de erros de amostragem, aumentando a chance de incluir qualquer área heterogênea do tumor, e para justificar a potencial perda de amostragem durante os cortes e a manipulação do bloco mestre.

4 MÉTODO

4.1 A AMOSTRA

4.1.1 Critérios de Inclusão e Revisão de Dados

A amostra estudada foi composta pelos espécimes cirúrgicos das lesões primárias de pacientes de ambos os sexos, qualquer faixa etária, portadores de melanoma cutâneo primário em fase de crescimento vertical, não metastático, operados entre 1997 até 2005 no Serviço de Cirurgia Oncológica do Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba, Paraná.

Foram revisadas lâminas coradas em hematoxilina-eosina destes pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo arquivadas no serviço de Anatomia Patológica do Hospital Nossa Senhora das Graças, inicialmente para confirmação diagnóstica e medida do índice de Breslow, bem como para a avaliação das margens cirúrgicas, do nível de Clark, do tipo histológico, para a contagem da taxa mitótica em 10 CGA (campos de grande aumento), para a avaliação da presença ou não de ulceração, da presença ou não de regressão histológica, da presença ou não de satelitose microscópica e da presença ou não do infiltrado linfocitário tumoral (TIL). A revisão, bem como todo o seguimento do projeto, foram feitos após aprovação da Comissão de Ética a qual a linha de pesquisa do projeto estava vinculada (ANEXOS 1 e 2).

4.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes com biópsia incisional prévia de seu melanoma, amostras insuficientes, casos de melanoma in situ e pacientes com metástases à distância.

4.2 DADOS CLÍNICO-CIRÚRGICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS TABULADOS

Foram tabulados os dados clínico-cirúrgicos relevantes dos pacientes selecionados para o estudo, bem como sua evolução, utilizando, para tanto, os prontuários do Hospital Nossa Senhora das Graças. As variáveis prognósticas tabuladas foram clínicas e anatomopatológicas. As variáveis clínicas tabuladas foram idade, sexo e localização da lesão. As variáveis anatomopatológicas tabuladas foram espessura tumoral (índice de Breslow), nível de Clark, taxa mitótica, ulceração, regressão histológica, satelitose e TIL. A sobrevida foi avaliada da seguinte maneira, como utilizado nos trabalhos que investigam fatores prognósticos (FRANCKEN et al., 2004):

A) Evolução favorável: vivos sem evidência de melanoma ou mortos por outras causas

B) Evolução desfavorável: vivos com evidência de melanoma (recidiva local, regional ou à distância) e mortos por melanoma

Em relação à espessura tumoral os casos foram divididos em grossos (G) e finos (F). Os melanomas grossos (G) foram considerados acima de 1mm de espessura, e os finos com 1mm ou menos.

A seguir foi realizada a avaliação do TIL, que foi morfológica, sempre com coloração hematoxilina-eosina, em um campo de objetiva de 10x dividindo os casos entre os com infiltrado *brisk* (B) e os casos com infiltrado *nonbrisk* (NB).

4.3 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Foi realizada no laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná pela técnica da imunoperoxidase após a confecção das lâminas histológicas utilizando a técnica de microarranjos

teciduais com equipamento adaptado de baixo custo.

4.3.1 Microarranjos Teciduais (TMA)

Esse método pode ser definido como a técnica para montagem de blocos de parafina, com múltiplas amostras para confecção de lâminas histológicas. A técnica para confeccionar blocos com múltiplas amostras já existe, conhecida como tissue microarray (TMA). No entanto, essa técnica é realizada por um aparelho automatizado. Uma vez que o Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR não possui esse aparelho, o método foi realizado de forma artesanal (protocolo de patente nº 1043).

Desde o início da técnica artesanal até a confecção das lâminas histológicas, foram necessários alguns passos, descritos abaixo.

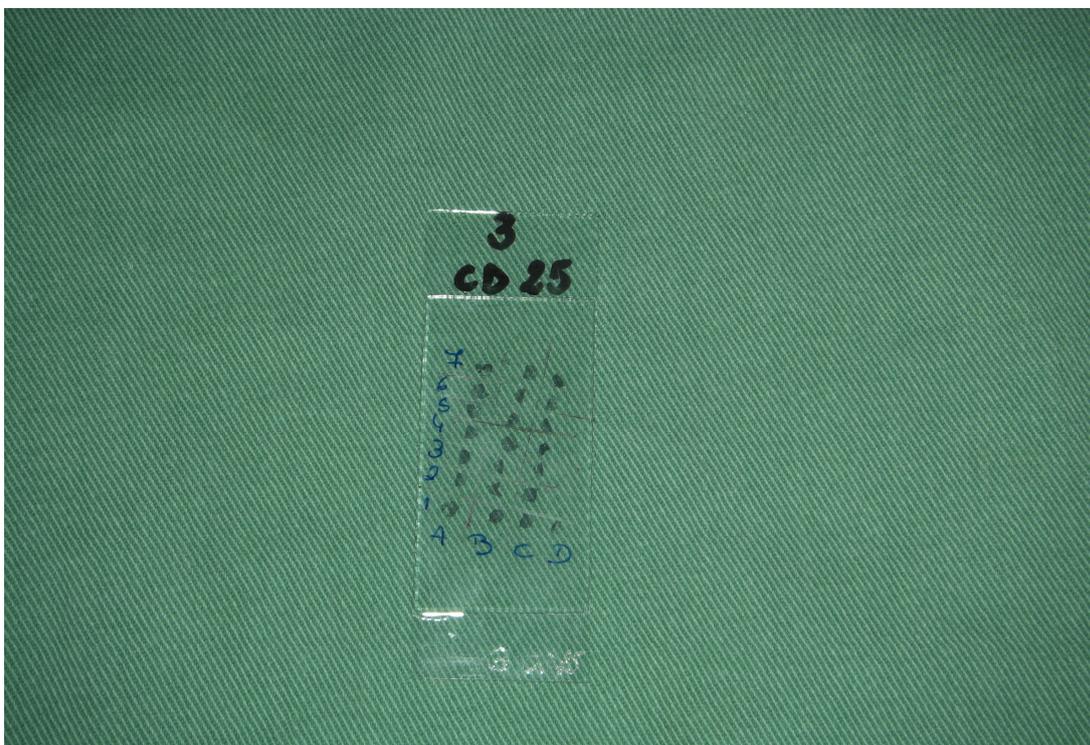
Foram confeccionados blocos parafinados comuns, contendo o melanoma estudado. Uma vez prontos esses blocos receberam o nome de blocos doadores. Foram retirados cortes dos blocos doadores, corados em coloração de rotina (Hematoxilina-Eosina). As lâminas confeccionadas foram analisadas em microscópio óptico (marca Olympus modelo BX 40), para observação dos melanomas. Foi localizada a região de interesse para amostragem em TMA e marcada com caneta. Através do sistema de espelho, a lâmina marcada foi utilizada para localização da região no bloco-doador, que por sua vez, também recebeu uma marcação. Foi escolhida a pinça do tipo Punch de biópsia de pele, com diâmetro de 2mm para retirada do fragmento de melanoma cutâneo. Para que os melanomas fossem devidamente localizados conforme sua identificação individual, foi confeccionado um mapa que serviu de apoio. Esse mapa segue o estilo de um plano cartesiano, onde as colunas são identificadas com letras e as linhas com números. Cada fragmento recebeu a identificação de uma letra mais um número (Ex A1). Essa identificação foi previamente estabelecida por um mapa com sua identificação original.

Uma vez montado o mapa, os blocos doadores foram organizados na bancada do laboratório conforme foi estabelecido pelo mesmo, da forma a serem utilizados sequencialmente para montagem do bloco final receptor. O bloco-receptor foi confeccionado, através dos seguintes passos:

- 1) Aquecimento da pinça do tipo Punch para penetração no bloco de parafina.
- 2) Introdução da pinça quente na área demarcada do bloco-doador.
- 3) Pressão e torção aplicadas na pinça para penetração e corte do fragmento.
- 4) Retirada da pinça contendo o fragmento de pele com melanoma.
- 5) Retirada do fragmento contido na pinça.

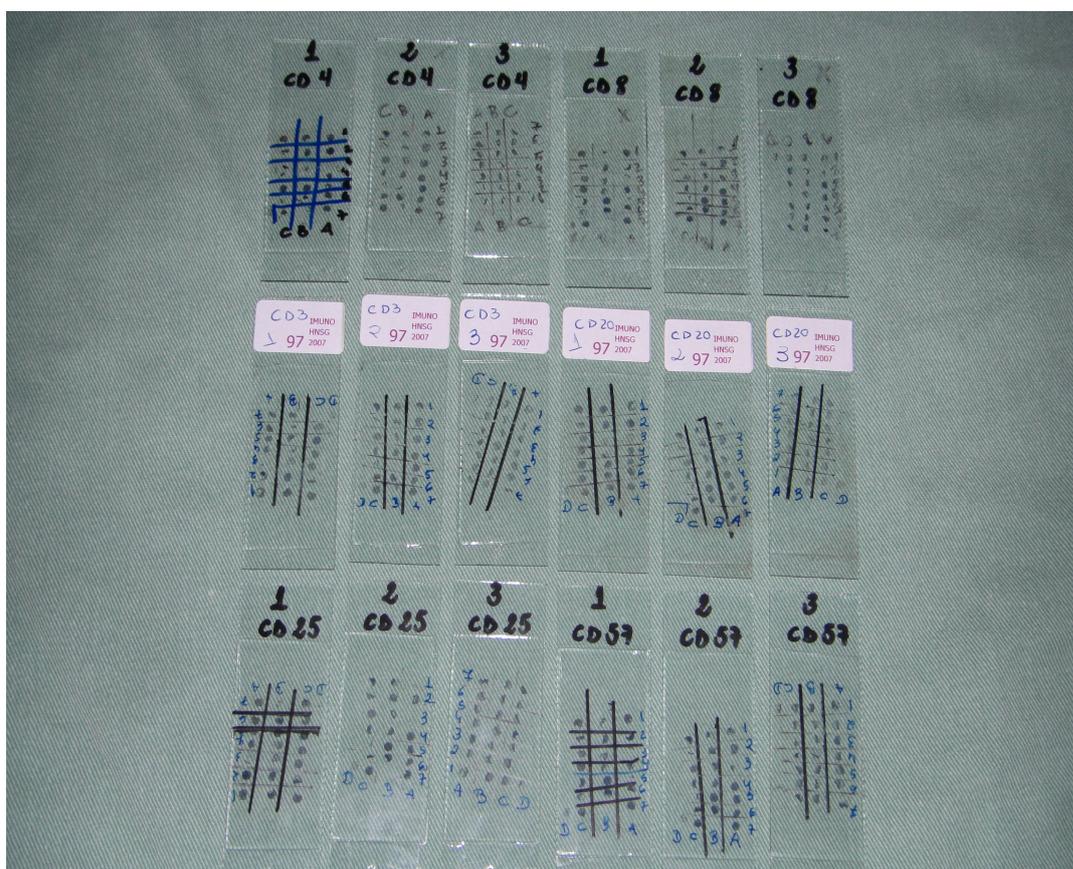
Após retirados os fragmentos de todos os blocos doadores, e estes organizados conforme o mapa, foram montados então três novos blocos receptores, contendo os múltiplos fragmentos de melanomas, provenientes das amostras desta pesquisa, sendo 1 com os casos de melanomas finos (F), e outros 2 e 3 com casos de melanomas grossos (G) – amostras superficiais (S) e profundas (P). Assim que pronto o blocos receptores, foram confeccionadas lâminas histológicas convencionais, onde a imagem formada se refere a um espéculo do mapa, conforme se observa nas figuras 6 e 7.

FIGURA 6 – EXEMPLO DE LÂMINA CONTENDO AMOSTRAS PROVENIENTES DOS MICROARRANJOS TECIDUAIS



LEGENDA: 3= NÚMERO DO TMA QUE CORRESPONDE AO MELANOMA GROSSO (G) PORÇÃO PROFUNDA (P); CD25= ANTICORPO TESTADO CD25; NÚMEROS DE 1 A 7= CORRESPONDEM AOS NÚMEROS DAS LINHAS; LETRAS DE A A D= CORRESPONDEM ÀS LETRAS DAS COLUNAS DO PLANO CARTESIANO DO TMA.

FIGURA 7 – TOTAL DE LÂMINAS PROVENIENTES DOS MICROARRANJOS TECIDUAIS DESTE ESTUDO



LEGENDA: 1= NÚMERO DO TMA QUE CORRESPONDE AO MELANOMA FINO(F); 2= NÚMERO DO TMA QUE CORRESPONDE AO MELANOMA GROSSO (G), PORÇÃO SUPERFICIAL (S); 3= NÚMERO DO TMA QUE CORRESPONDE AO MELANOMA GROSSO (G) PORÇÃO PROFUNDA (P); CD4= ANTICORPO TESTADO CD4; CD8= ANTICORPO TESTADO CD8; CD3= ANTICORPO TESTADO CD3; CD20= ANTICORPO TESTADO CD20; CD25= ANTICORPO TESTADO CD25; CD57= ANTICORPO TESTADO CD57; NÚMERO DE 1 A 7= CORRESPONDEM AOS NÚMEROS DAS LINHAS DO PLANO CARTESIANO DO TMA; LETRAS DE A A D= CORRESPONDEM ÀS LETRAS DAS COLUNAS DO PLANO CARTESIANO DO TMA.

4.3.2 Técnica de Imunohistoquímica

Para análise imunohistoquímica foram necessários o uso de alguns componentes, sendo utilizados alguns marcadores linfocitários para qualificar a resposta inflamatória tumoral. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários (Novocastra ®):

Anticorpo CD3, que é um pan-marcador de células T

Anticorpo CD4, que marca células T auxiliaadoras

Anticorpo CD8, que marca células T citotóxicas

Anticorpo CD20, que marca células B

Anticorpos CD25, que marca receptor de interleucina-2 (IL-2)

Anticorpos CD57, que marca células *natural killers* (NK)

4.3.2.1 Anticorpo CD3

A molécula CD3 consiste de cinco diferentes cadeias de polipeptídeos com pesos moleculares variando 16 a 28kD. O Antígeno CD3 é primeiramente detectado em timócitos precoces e seu aparecimento provavelmente representa um dos primeiros sinais do comprometimento da linhagem de células T. É considerado portanto um pan-marcador de células T. A diluição utilizada foi 1:600.

4.3.2.2 Anticorpo CD4

A molécula CD4 (T4) é uma glicoproteína transmembrana de cadeia simples com um peso molecular de 59kD. O antígeno CD4 é expresso em células T auxiliaadoras representando 45% dos linfócitos sanguíneos periféricos e em menor nível nos monócitos. A maioria dos casos de linfoma de células T

cutâneo, incluindo micose fungóide, expressa o antígeno CD4; a leucemia de células T em adultos associada ao HTLV-1 também é geralmente CD4+. A diluição utilizada foi de 1:20.

4.3.2.3 Anticorpo CD8

A molécula CD8 é composta por duas cadeias e tem um peso molecular de 32kD. É encontrada em células T citotóxicas que correspondem a 20 a 35% dos linfócitos humanos periféricos. O antígeno CD8 também pode ser encontrado em células *natural killer*, 80% dos timócitos, em uma subpopulação de 30% de células sanguíneas periféricas nulas e 15 a 30% de células da medula óssea. A diluição utilizada foi de 1:200.

4.3.2.4 Anticorpo CD20

O antígeno CD20 é uma fosfoproteína não-glicosilada de aproximadamente 33kD que é expressa em células B humanas normais ou malignas e acredita-se agir como receptor durante a ativação e diferenciação da célula B. Relata-se sua expressão em células B normais de sangue periférico, linfonodos, baço, tonsilas palatinas, medula óssea, leucemias agudas e leucemias linfocíticas crônicas. A diluição utilizada foi de 1:1000.

4.3.2.5 Anticorpo CD25

O antígeno CD25, a subunidade alfa do receptor de IL-2, é uma glicoproteína de cadeia simples com um peso molecular de 55kD. Após a ativação das células T com antígeno ou mitógeno na presença de interleucina-1 (IL-1), a IL-2 é rapidamente sintetizada e secretada. Em resposta a isto, uma subpopulação de células T expressa receptores de alta afinidade a IL-2. Estas

células proliferam, expandindo a população de células T capaz de mediar funções de auxílio, de supressão e de citotoxicidade. O receptor de IL-2 não é exclusivamente encontrado em células T é relatado ser expresso em células B e T transformadas por HTLV, células B transformadas por EBV, precursores mielóides e oligodendrócitos. É ausente em timócitos, células T em repouso, células B não-ativadas e células nulas. A expressão do receptor de IL-2 está associada a condições inflamatórias e malignas, neoplasia linfóide, doenças autoimunes e rejeição a enxertos. A diluição utilizada foi de 1:400.

4.3.2.6 Anticorpo CD57

A glicoproteína associada mielóide CD57 , também conhecida como HNK-1, tem um peso molecular de 110kD. A molécula CD57 é encontrada em um subtipo de células mononucleares com atividade *natural killer* e em células neuroectodérmicas expressando glicoproteína mielina-associada. Muitas células que co-expressam proteínas CD57 e CD8 são um subtipo de células T supressoras / citotóxicas. Estas células têm um papel na rejeição a enxertos na doença aguda de enxerto *versus* hospedeiro. A molécula de CD57 não é expressa em eritrócitos ou plaquetas. A diluição utilizada foi de 1:200.

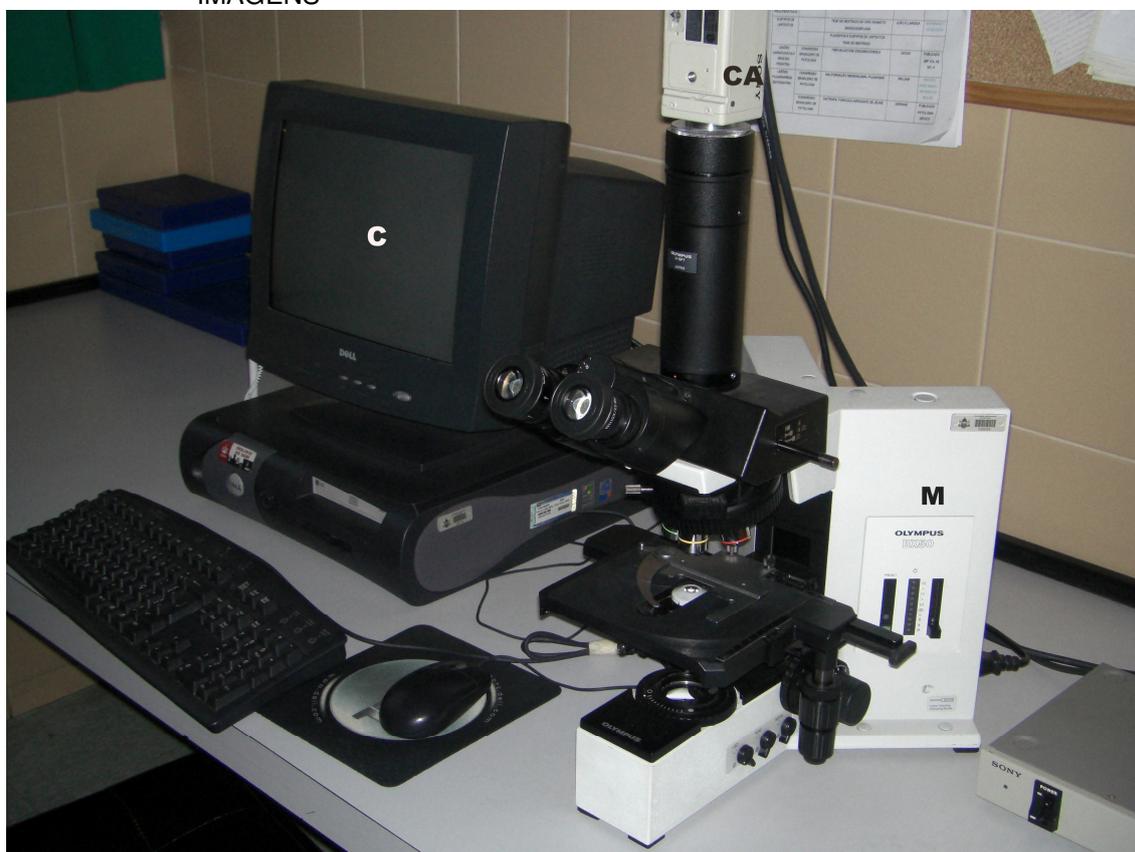
A imunoglobulina de cabra anti-camundongo, conjugada à um polímero de dextrana marcado com peroxidase (Envision⁺/Peroxidase - DakoCytomation[®]), foi utilizada como anticorpo secundário; e DAB Líquido da DakoCytomation[®], como revelador. A recuperação antigênica foi realizada pelo kit ImmunoRetreiver Bio SB[®].

Todas as reações foram controladas com controles negativos e positivos. A amígdala palatina hiperplásica serviu para controle positivo para todos os anticorpos utilizados. Reações onde o anticorpo era omitido serviram como controle negativo.

4.3.3 Materiais para Obtenção das Fotomicrografias e dos Resultados

Para obtenção das imagens, foi utilizado o microscópio da marca Olympus, modelo BX 50 acoplado a uma câmera marca Sony, modelo DXC 107A. Esse microscópio está ligado a um computador, que capta as imagens através do software IMAGE Pro-plus (FIGURA 8).

FIGURA 8 - MICROSCÓPIO ACOPLADO AO COMPUTADOR PARA A CAPTURA DAS IMAGENS

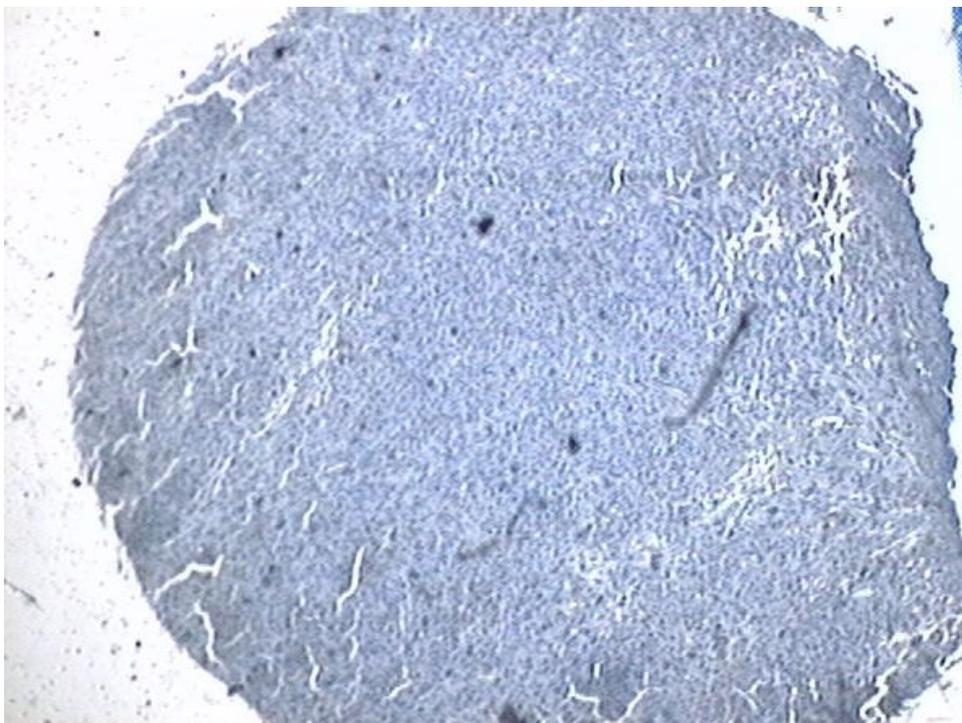


LEGENDA: CA= CÂMERA; C= COMPUTADOR; M= MICROSCÓPIO.

4.3.4 Método de Leitura

A técnica de microarranjo utilizada fornecia amostras que nem sempre eram 100% adequadas para leitura. Foi realizada, portanto, antes da leitura propriamente dita, a avaliação da adequabilidade das amostras, utilizando no microscópio objetiva de 4x para avaliar o quanto do total da amostra era passível de leitura. Convencionou-se dividir entre amostras 100%, 75%, 50% e 25% “adequadas”, de acordo com o quanto da amostra poderia ser utilizado. As amostras 100% adequadas têm uma forma arredondada ou circular (FIGURA 9); as amostras com 50% de adequabilidade têm forma de meia-lua ou semicírculo; as amostras 75% adequadas estavam entre um semicírculo e um círculo completo; as amostra 25% adequadas eram a metade de um semicírculo. A amostra adequada não era considerada adequada quando havia necrose, fibrose ou descolamento do corte da lâmina.

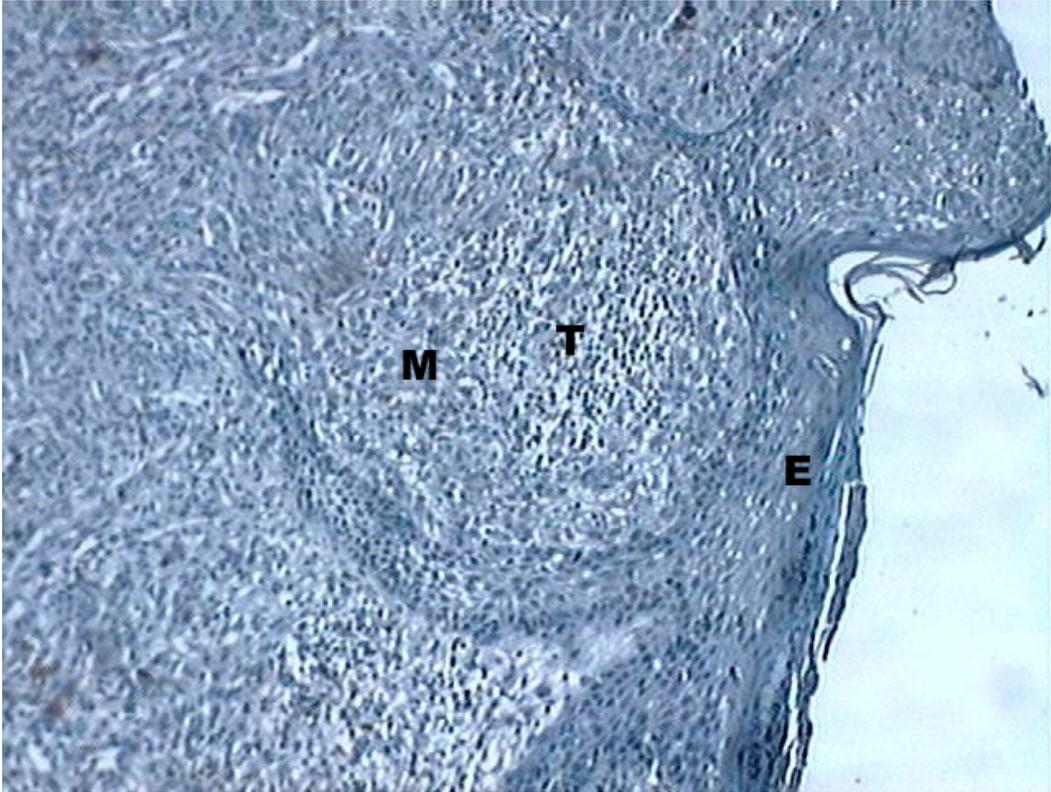
FIGURA 9 - EXEMPLO DE AMOSTRA 100% ADEQUADA



Na seqüência, foi realizada a leitura das lâminas de imunohistoquímica em TMA quanto à sua marcação pelos anticorpos CD4, CD8, CD3, CD20, CD25 e CD57. Para cada amostra foi feita a leitura com aumento na objetiva de 40x, sendo feita a contagem dos linfócitos marcados em cada campo de grande aumento (CGA), e a seguir calculada a média de linfócitos marcados por amostra de acordo com os valores obtidos para cada CGA. Os valores médios por CGA foram anotados em percentuais para os anticorpos CD4, CD8, CD3 e CD20. Os valores percentuais foram entre amostras com marcação positiva <25% (escassa) ou ≥25% (intensa) para facilitar a análise estatística posterior. Já para os anticorpos CD25 e CD57 os valores médios por amostra foram anotados em número absoluto. Para fins de análise estatística, a análise do CD25 foi dividida entre os casos com <1,5 linfócitos marcados na média dos CGA (escassa) e aqueles com 1,5 ou mais linfócitos marcados por CGA em média (intensa). Para o CD57, utilizou-se um valor de corte de 5, dividindo os casos entre linfócitos marcados em média por CGA <5 (escassa) e aqueles com 5 ou mais linfócitos marcados em média por CGA (intensa).

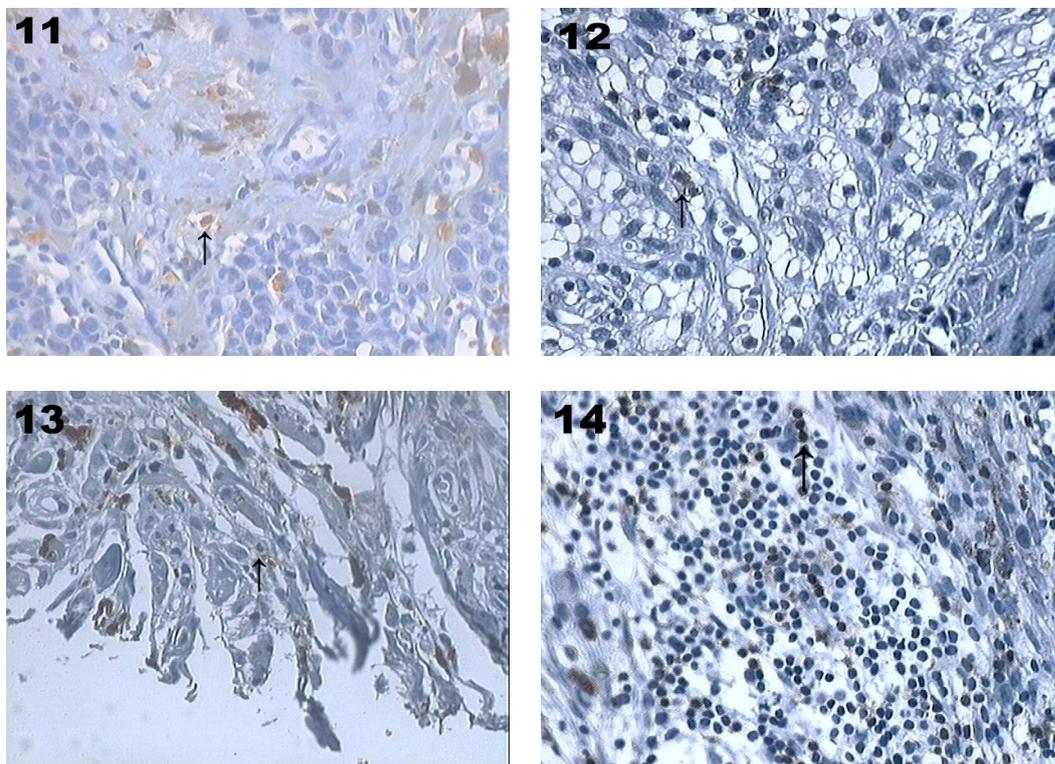
Após a captura das imagens, conseguiu-se as imagens representadas pelas figuras a seguir, através das quais foram feitas as leituras dos resultados.

FIGURA 10 - INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL (TIL)



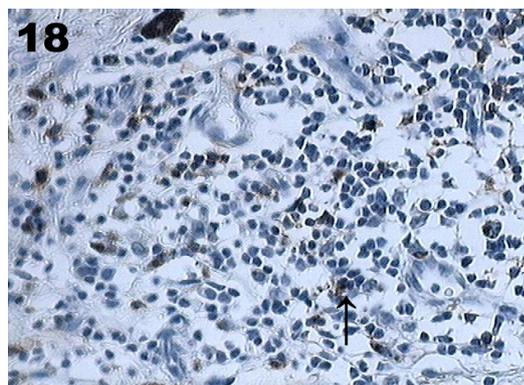
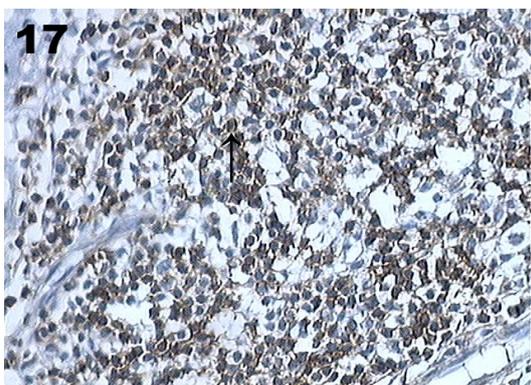
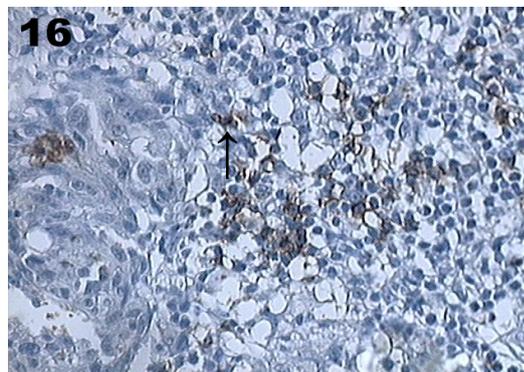
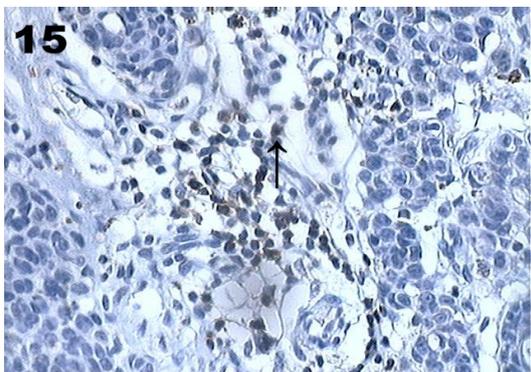
LEGENDA: (E)= EPIDERME; (M)= CÉLULAS DO MELANOMA; (T)= TIL.

FIGURAS 11, 12, 13 e 14 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD4 E CD8 EM MELANOMAS GROSSOS, AMOSTRAS SUPERFICIAIS E PROFUNDAS, 40X. FIGURA 11 - CD4 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA SUPERFICIAL. FIGURA 12 - CD8 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA SUPERFICIAL. FIGURA 13 - CD4 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA PROFUNDA. FIGURA 14 - CD8 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA PROFUNDA.



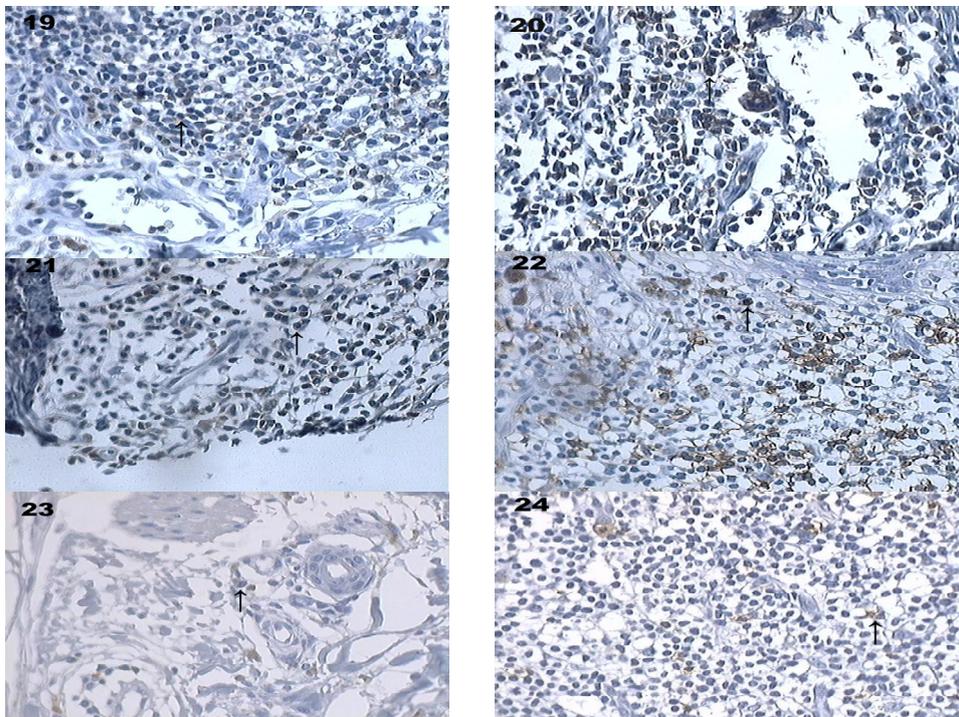
LEGENDA: SETA MARCANDO LINFÓCITO T CD4+ E T CD8+ POSITIVOS NA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O ANTICORPO ANTI-CD4 E ANTI-CD8, RESPECTIVAMENTE

FIGURAS 15, 16, 17 E 18 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD3 E CD20 EM MELANOMAS GROSSOS, AMOSTRAS SUPERFICIAIS E PROFUNDAS (40X). FIGURA 15 - CD3 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA SUPERFICIAL. FIGURA 16 - CD20 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA SUPERFICIAL. FIGURA 17 - CD3 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA PROFUNDA. FIGURA 18 - CD20 EM MELANOMA GROSSO, AMOSTRA PROFUNDA.



LEGENDA: SETA MARCANDO LINFÓCITO T CD20+ E TCD3+ POSITIVOS NA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O ANTICORPO ANTI-CD20 E ANTI-CD3, RESPECTIVAMENTE.

FIGURAS 19, 20, 21, 22, 23, 24 - IMUNOMARCAÇÃO COM CD4, CD8, CD3, CD20, CD25 E CD57 EM MELANOMAS FINOS (40X). FIGURA 19- CD4; FIGURA 20- CD8; FIGURA 21- CD3; FIGURA 22- CD20; FIGURA 23- CD25; FIGURA 24- CD57



LEGENDA: SETA MARCANDO LINFÓCITO TCD4+, TCD8+, TCD3+, TCD20+, TCD25+ E TCD57+ NA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O ANTICORPOS ANTI-CD4, CD8, CD3, CD20, CD25 E CD57.

4.3.5 Correlação de Todos os Dados e Análise Estatística

Após a obtenção dos dados clínicos e dos estudos anatomopatológicos e imunohistoquímicos foi realizada uma comparação entre a intensidade do TIL presente em cada grupo, sendo feita uma análise estatística, para avaliar se houve relação entre a quantidade e qualidade do TIL e os índices preditivos e prognósticos dos pacientes com melanoma cutâneo que fizeram parte da população estudada.

Para avaliação univariada da associação entre variáveis demográficas, de localização do tumor e anatomopatológicas com a variável infiltração linfocitária tumoral, considerou-se o teste exato de Fisher. Esta avaliação de forma multivariada, foi feita considerando-se o modelo de Regressão Logística e o teste de Wald. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

Para cada uma das variáveis, testou-se a hipótese nula de inexistência de associação entre a variável sob análise e tipo de infiltração linfocitária tumoral, versus a hipótese alternativa de existência de associação. Esta avaliação foi feita de forma univariada e multivariada. Na avaliação multivariada o valor de p apresentado para cada variável é calculado na presença das demais variáveis incluídas no modelo.

Nos marcadores onde houve duas classificações, avaliou-se a hipótese nula de inexistência de associação entre o marcador e a infiltração linfocitária tumoral, versus a hipótese alternativa de existência de associação.

5 RESULTADOS

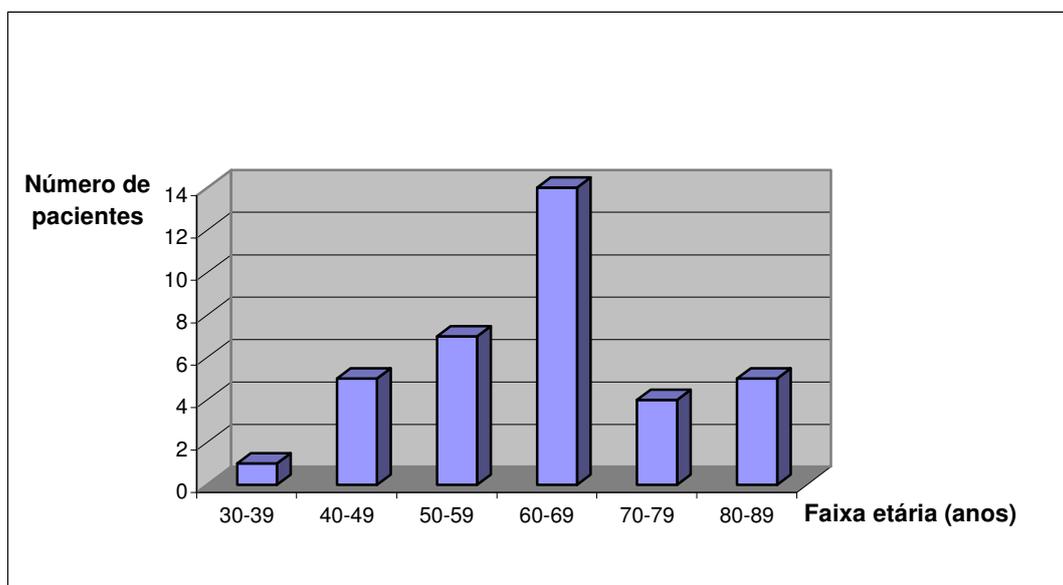
5.1 ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS

Foram avaliados espécimes cirúrgicos obtidos de 43 pacientes portadores de melanoma cutâneo primário submetidos a tratamento cirúrgico, no Hospital Nossa Senhora das Graças, em Curitiba, Paraná, no período de 1997 a 2005.

5.1.1 Idade

A idade média dos pacientes foi de 62,2 anos, com variação de 37 a 87 anos. (GRÁFICO 1).

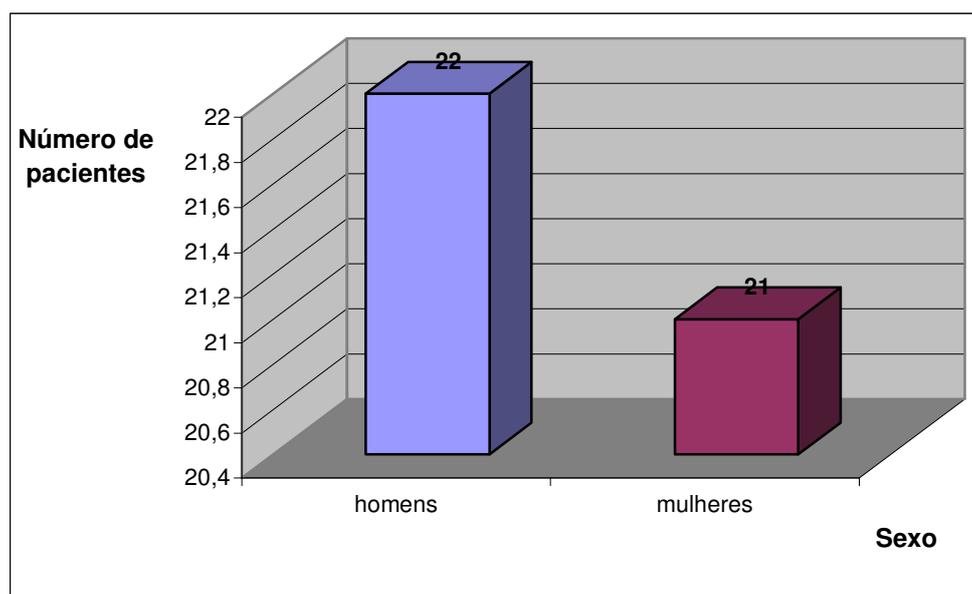
GRÁFICO 1 - FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES COM MELANOMA



5.1.2 Sexo

Dos 43 espécimes cirúrgicos estudados, 22 eram provenientes de homens e 21 de mulheres.

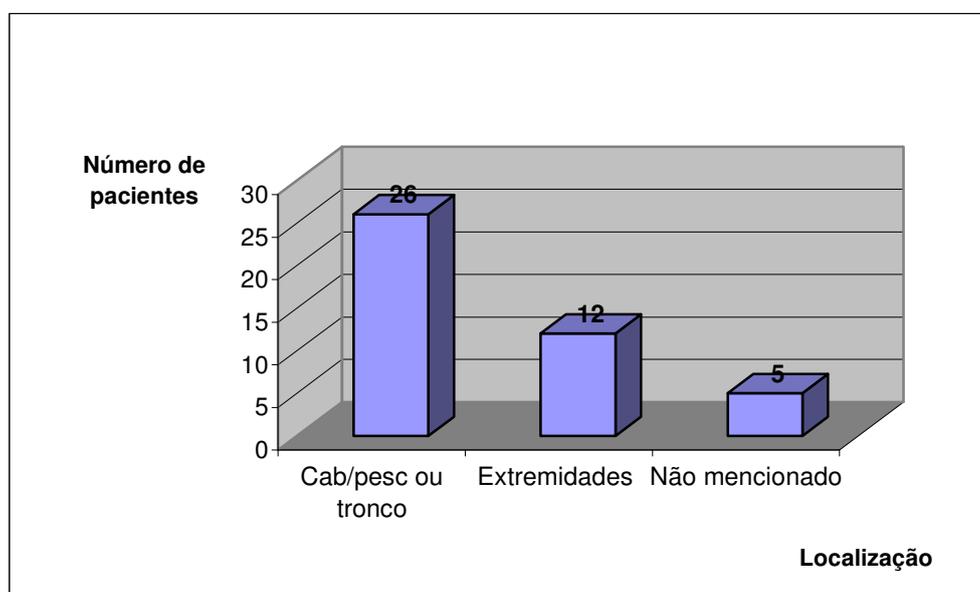
GRÁFICO 2 – SEXO DOS PACIENTES COM MELANOMA



5.1.3 Localização Tumoral

Quando à localização tumoral, 26 (60,4%) eram provenientes de cabeça e pescoço (cab/pesc) ou tronco, enquanto 12 (27,9%) melanomas eram de extremidades, e 5 (11,6%) sem menção de localização.

GRÁFICO 3 – LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES

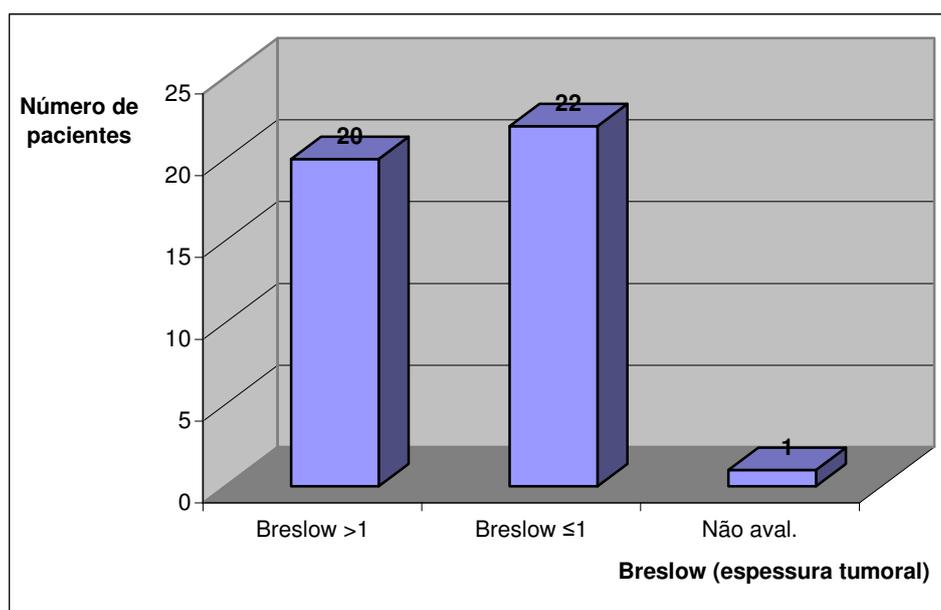


5.2 ANÁLISE DOS DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

5.2.1 Índice de Breslow

O índice de Breslow foi aferido e verificou-se que em 20 casos (43,5%) era maior que 1mm e em 22 casos (51,2%) foi menor ou igual a 1 mm; em 1 caso o índice de Breslow foi considerado não avaliável, apesar de ser grosso, pois este melanoma estava muito ulcerado e de difícil avaliação da precisa espessura. Para efeito da imunohistoquímica este caso foi considerado grosso, como será mostrado adiante na análise dos dados imunohistoquímicos.

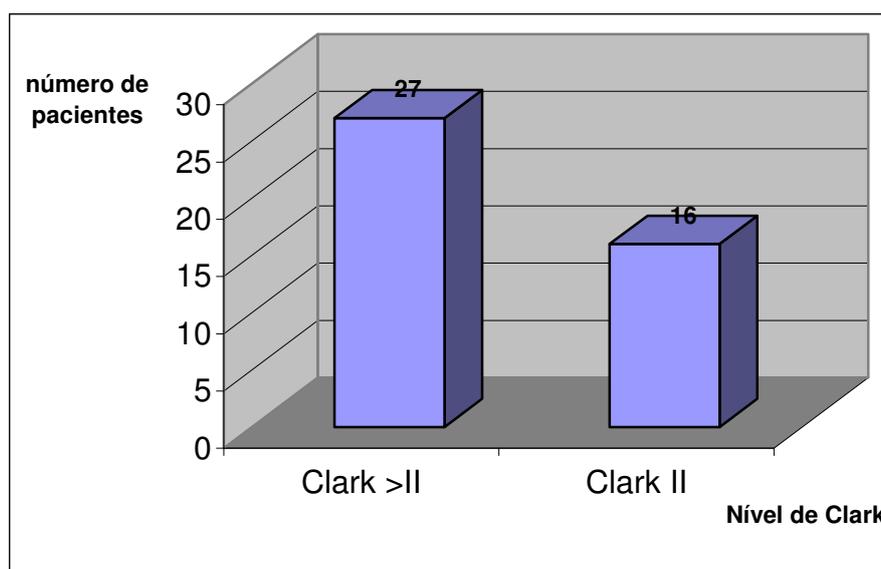
GRÁFICO 4 – ÍNDICE DE BRESLOW (ESPESSURA TUMORAL EM MILÍMETROS)



5.2.2 Nível de Clark

Quanto ao nível de Clark, 27 melanomas (62,8%) eram Clark >II, enquanto que 16 melanomas (37,2%) eram Clark II.

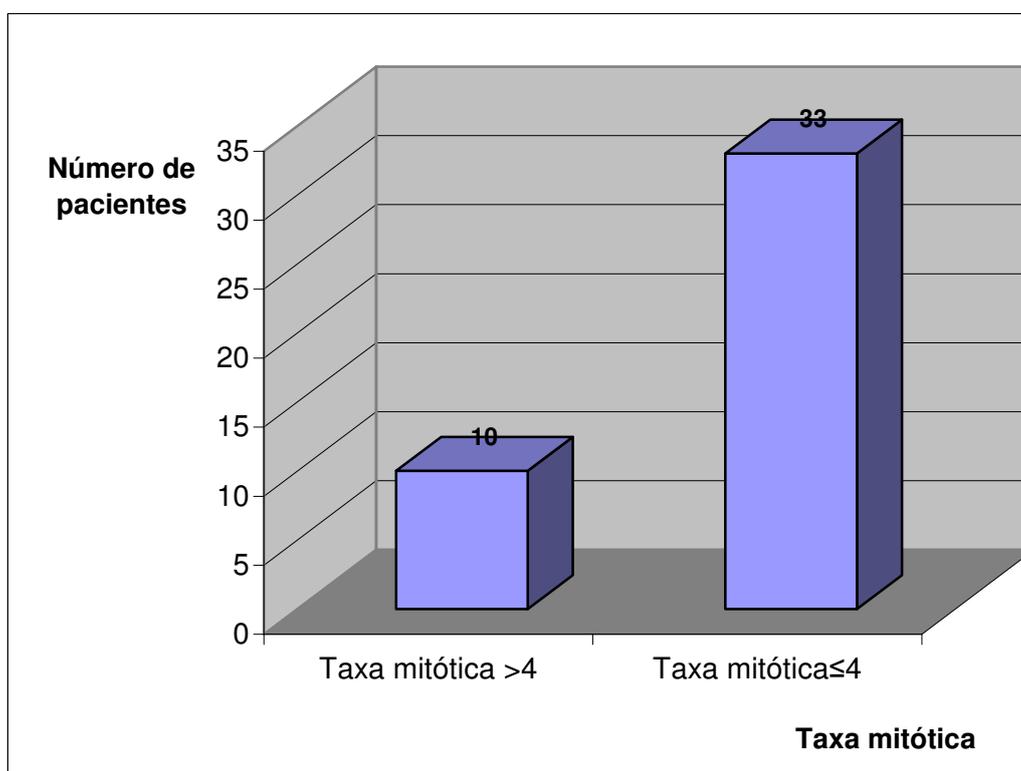
GRÁFICO 5 – AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CLARK DOS MELANOMAS



5.2.3 Taxa Mitótica

A taxa mitótica foi >4 em 10/43 pacientes (23,3%), e ≤ 4 em 33/43 pacientes (73,7%).

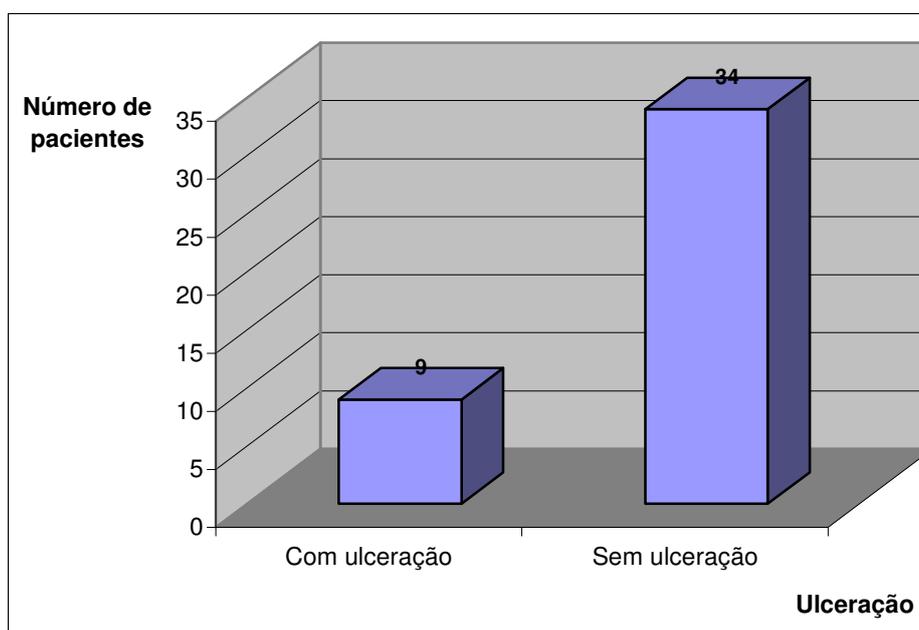
GRÁFICO 6 – TAXA MITÓTICA NOS MELANOMAS PRIMÁRIOS



5.2.4 Ulceração Tumoral

Houve ulceração em 9/43 dos melanomas primários estudados (20,9%), enquanto não apresentavam ulceração 34/43 melanomas (79,1%).

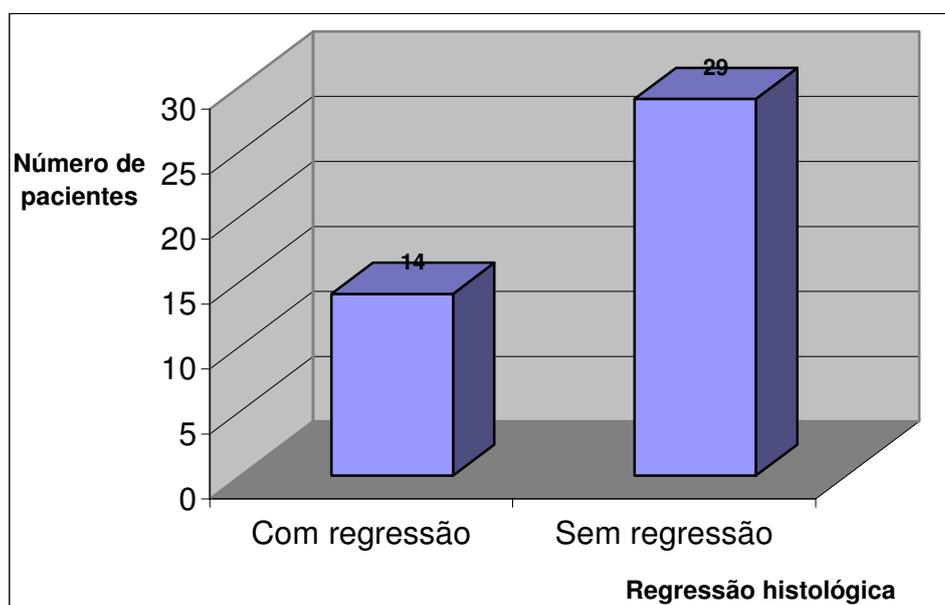
GRÁFICO 7 – ULCERAÇÃO NOS MELANOMAS



5.2.5 Regressão Histológica

A regressão histológica esteve presente em 14/43 melanomas (32,6%) e ausente em 29/43 melanomas (67,4%).

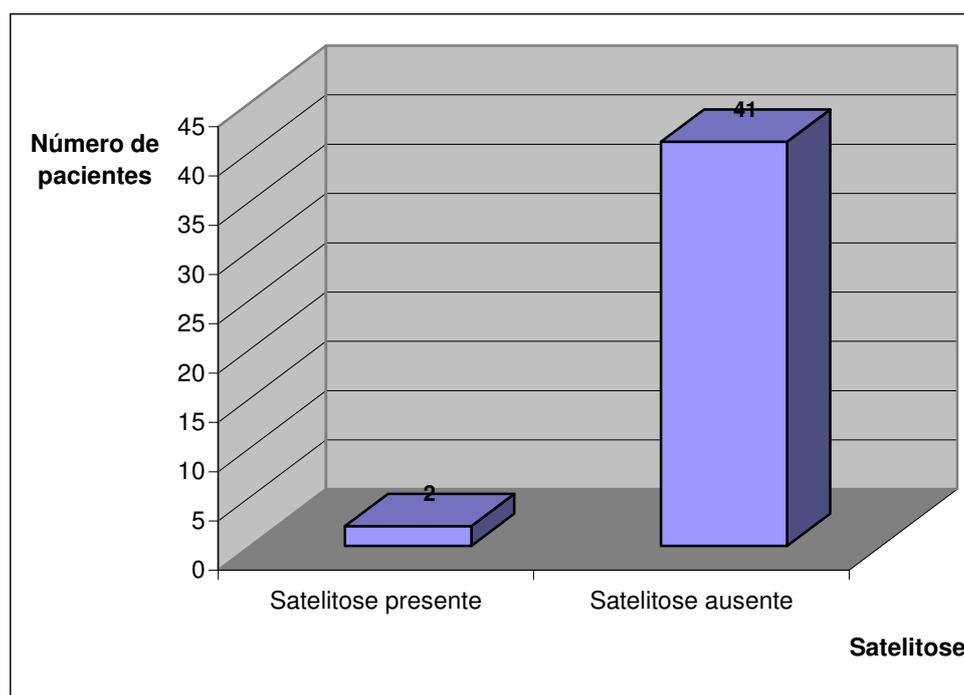
GRÁFICO 8 – REGRESSÃO HISTOLÓGICA NOS MELANOMAS



5.2.6 Satelitose Microscópica

A satelitose microscópica esteve presente em somente 2 dos 43 pacientes estudados (4,7%), e ausente em 41/43 pacientes (95,3%).

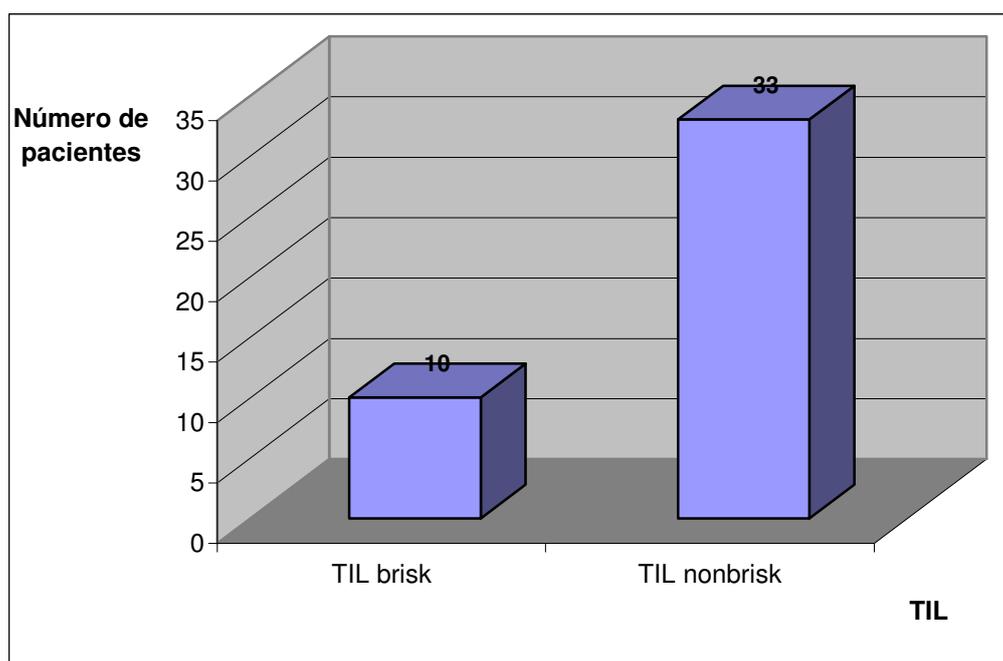
GRÁFICO 9 – SATELITOSE



5.2.7 Infiltrado Linfocitário Tumoral (TIL)

O TIL foi *brisk* em 10/43 pacientes (23,3%), e *nonbrisk* em 33/43 pacientes (73,7%).

GRÁFICO 10 – TIL



5.2.7.1 TIL Comparado ao Sexo dos Pacientes com Melanoma

Entre os melanomas dos pacientes masculinos, 15 (68,2%) apresentaram TIL *nonbrisk*, enquanto que 7 (31,8% dos) apresentaram TIL *brisk*; já nos melanomas das mulheres do estudo, 18 (85,7%) eram *nonbrisk*, enquanto que 3 (14,3%) eram *brisk* ($p=0,281$ nas análises uni e multivariada). A tabela 1 mostra estes dados.

5.2.7.2 TIL Comparado à Idade dos Pacientes com Melanoma

Nos melanomas dos pacientes ≤ 60 anos, 12/15 (80%) eram *nonbrisk*, enquanto que 3/15 (20%) eram *brisk*; nos melanomas dos pacientes > 60 anos, 18/23 (78,3%) eram *nonbrisk*, enquanto que 5/23 (21,7%) eram *brisk* ($p=1$ na análise univariada e $p=0,196$ na análise multivariada). A tabela 1 mostra estes dados.

5.2.7.3 TIL Comparado à Localização Tumoral nos Pacientes com Melanoma

Houve 26 (60,4%) melanomas primários em cabeça e pescoço ou tronco, 12 localizados em extremidades (27,9%) e 5 (11,6%) sem localização (vide tabela 1).

5.2.7.4 TIL Comparado ao Índice de Breslow nos Pacientes com Melanoma

Nos melanomas com índice de Breslow ≤ 1 mm, houve 13/22 casos com TIL *nonbrisk*, e 9/22 casos com TIL *brisk*; nos melanomas com Breslow > 1 mm,

houve 19/20 casos com TIL *nonbrisk*, e 1/20 casos com TIL *brisk*. Nota-se portanto que nos melanomas finos não houve diferença importante na intensidade do infiltrado como se detectou nos melanomas espessos, em que houve predomínio do infiltrado *nonbrisk* ($p=0,010$ na análise univariada e $p=0,024$ na análise multivariada). Estes dados podem ser observados na tabela 1.

5.2.7.5 TIL Comparado ao Nível de Clark nos Pacientes com Melanoma

Quanto ao índice de Clark e sua relação com o TIL, dos 16 pacientes com Clark II, 12/16 (75%) foram classificados como *nonbrisk*, e 4/16 (25%) foram classificados como *brisk*; houve 27 melanomas com Clark>II, sendo que 21/27 (77,8%) foram considerados *nonbrisk*, e 6/27 (22,2%) *brisk* ($p=0,999$ na análise univariada e 0,036 na multivariada). A tabela 1 contém estes dados.

5.2.7.6 TIL Comparado à Taxa Mitótica nos Pacientes com Melanoma

A taxa mitótica foi dividida em ≤ 4 ou >4 por 10 campos de grande aumento (CGA); nos melanomas com taxa mitótica ≤ 4 , 24/33 (72,7%) foram *nonbrisk*, e 9/31 (27,3%) foram *brisk*; dos melanomas com taxa mitótica >4 por 10 CGA, 9/10 (90%) foram *nonbrisk*, enquanto que 1/10 (10%) foram *brisk* ($p=0,407$ na análise univariada e 0,287 na multivariada). Observe a tabela 1.

5.2.7.7 Ulceração Tumoral Comparada ao TIL nos Pacientes com Melanoma

Todos os 9 melanomas com ulceração tiveram seu TIL classificado

como *nonbrisk* (100% dos ulcerados); já dos melanomas sem ulceração, que eram em número de 34, 24/34 (70,6%) tiveram seu TIL classificado como *nonbrisk*, e 10/34 (29,4%) como *brisk* ($p=0,089$ na análise univariada; não pode ser feita a análise multivariada pois não houve caso *brisk* nos melanomas com ulceração). A tabela 1 mostra estes dados.

5.2.7.8 Regressão Histológica Comparada ao TIL nos Pacientes com Melanoma

Nos melanomas com regressão histológica presente (14/43), 10 tiveram o TIL classificado como *nonbrisk* (71,4%), enquanto que 4 foram considerados *brisk* (28,6%); nos melanomas sem regressão (29/43), 23 foram *nonbrisk* (79,3%) e 6 foram *brisk* (20,7%). ($p=0,704$ na análise univariada e 0,052 na multivariada). Observe a tabela 1 onde os dados estão presentes.

5.2.7.9 Satelitose Microscópica Comparada ao TIL nos Pacientes com Melanoma

Quando se compara a satelitose microscópica com o TIL, nos pacientes sem satelitose, que são 41/43, 31 (72,1%) tiveram seu TIL classificado como *nonbrisk*, enquanto que os outros 10 (27,9%) tiveram o seu TIL classificado como *brisk*; todos os 2 melanomas com satelitose estavam com seu TIL *nonbrisk* (100%). A tabela 1 mostra estes dados.

TABELA 1 – COMPARAÇÃO DO TIL COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS. ANÁLISE UNIVARIADA E MULTIVARIADA

Variáveis Clínicas	Brisk	Non-Brisk	Univariada	Multivariada
Sexo Feminino	3	18	ns	ns
Sexo Masculino	7	15	ns	ns
Idade < 60 anos	3	12	ns	ns
Idade > 60 anos	5	18	ns	ns
Localização Tronco, Cabeça e Pescoço	5	24	ns	ns
Localização Membros	3	9	ns	ns
Variáveis Anatomopatológicas	Brisk	Non-Brisk	Univariada	Multivariada
Breslow Fino	9	13	0,010	0,024
Breslow Grosso	1	19	0,010	0,024
Clark II	4	12	ns	0,036
Clark > 2	6	24	ns	0,036
Mitoses <= 4	9	24	ns	ns
Mitoses > 4	1	9	ns	ns
Ulceração Presente	0	9	0,089*	ns
Ulceração Ausente	10	24	0,089*	ns
Regressão Presente	4	10	ns	0,052*
Regressão Ausente	6	23	ns	0,052*
Satelite Presente	0	2	ns	ns
Satelite Ausente	10	34	ns	ns

LEGENDA: NS- NÃO ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVO
 (*)- MOSTRAM UMA TENDÊNCIA

5.3 ANÁLISE DOS DADOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

TABELA 2 - CORRELACIONA OS ANTICORPOS TESTADOS NO TIL BRISK E NONBRISK DOS MELANOMAS GROSSOS (AMOSTRAS SUPERFICIAIS E PROFUNDAS) E FINOS

	BRISK			NONBRISK		
	FINO	GROSSO SUP	GROSSO PROF	FINO	GROSSO SUP	GROSSO PROF
CD3 ESCASSO	1	0	1	3	7	5
CD3 INTENSO	8	1	0	10	13	15
TOTAL CD3	9	1	1	13	20	20
CD20 ESCASSO	6	1	0	13	13	15
CD20 INTENSO	3	0	1	0	6	3
TOTAL CD20	9	1	1	13	19*	18**
CD4 ESCASSO	6	0	1	7	1	19
CD4 INTENSO	2	1	0	6	18	1
TOTAL CD4	8	1	1	13	19*	20
CD8 ESCASSO	3	1	1	6	11	7
CD8 INTENSO	6	0	0	7	8	12
TOTAL CD8	9	1	1	13	19*	19*
CD25 ESCASSO	6	0	0	8	11	6
CD25 INTENSO	3	1	1	5	8	14
TOTAL CD25	9	1	1	13	19*	20
CD57 ESCASSO	0	0	0	4	7	8
CD57 INTENSO	9	1	1	9	12	11
TOTAL CD57	9	1	1	13	19*	19*

OBS: NENHUM ANTICORPO TESTADO APRESENTOU SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA. HOUVE UMA TENDÊNCIA (P=0,055) SOMENTE NOS CASOS DE MELANOMAS FINOS MARCADOS PARA CD20

(*)- UM CASO EXCLUÍDO POR INADEQUABILIDADE DAS REAÇÕES

(**)- DOIS CASOS EXCLUÍDOS POR INADEQUABILIDADE DAS REAÇÕES

5.3.1 Análise do Anticorpo Anti-CD4

5.3.1.1 Amostras Superficiais dos Melanomas Grossos

Foram consideradas adequadas para avaliação 20 amostras superficiais dos melanomas grossos (100% dos casos) corados com anticorpo anti-CD4. Dentre estas, nos melanomas que estavam com TIL *nonbrisk*, 1/19 teve marcação escassa de CD4+. Já 18/19 tiveram marcação intensa. No único melanoma grosso *brisk* a marcação foi intensa ($p=1$).

5.3.1.2 Amostras Profundas de Melanomas Grossos

Houve adequabilidade em 21 amostras profundas nos melanomas grossos com a coloração com anticorpo para CD4 (20 grossos mais 1 grosso ulcerado), sendo que em 20 amostras o TIL foi considerado *nonbrisk*, e em 1 amostra o infiltrado foi considerado *brisk*; em 19/20 casos *nonbrisk* houve marcação escassa para CD4+, e em 1 caso *nonbrisk* houve marcação intensa. No único caso *brisk* a marcação do CD4+ foi escassa ($p=1$).

5.3.1.3 Melanomas Finos

Nos casos de melanomas finos ($n=22$) foi realizada somente uma amostra por caso, já que esta seria suficiente para avaliar o TIL. A contagem de linfócitos CD4 nos melanomas finos mostrou-se no seguinte padrão: nos casos com TIL *nonbrisk*, 7/13 amostras tiveram marcação escassa para CD4+, enquanto que 6/13 amostras foram consideradas com marcação intensa. Nos casos com TIL *brisk*, 6/8 amostras tiveram marcação escassa para CD4+, enquanto que 2/8 amostras tiveram marcação intensa ($p=0,400$). Um caso foi desconsiderado no estudo imunohistoquímico para CD4 por inadequabilidade da amostra.

5.3.2 Análise do Anticorpo Anti-CD8

5.3.2.1 Amostras Superficiais dos Melanomas Grossos

A contagem de CD8 nas amostras superficiais dos melanomas grossos mostrou-se da seguinte maneira: 11/19 casos com marcação escassa para CD4+ nos melanomas grossos com TIL *nonbrisk*; 8/19 casos com marcação intensa nos melanomas grossos com TIL *nonbrisk*; 1/1 caso com marcação escassa em CD4+ nos melanomas grossos com TIL *brisk* ($p=1$).

5.3.2.2 Amostras Profundas dos Melanomas Grossos

Nos melanomas grossos, amostras profundas, a contagem de CD8+ foi dividida em marcação escassa para CD8+ em 7/19 casos *nonbrisk*, e marcação intensa em 12/19 casos *nonbrisk*; no único caso *brisk* dos melanomas espessos, a marcação para CD8+ foi escassa na média dos campos da amostra colhida por microarranjo tecidual ($p=0,400$).

5.3.2.3 Melanomas Finos

Nos melanomas finos, 6/13 melanomas com infiltrado *nonbrisk* tiveram marcação escassa para CD8+ na média dos campos das amostras; já 7/13 melanomas finos *nonbrisk* tiveram marcação intensa para CD8+; 3/9 melanomas finos com TIL *brisk* tiveram marcação escassa enquanto que 6/9 melanomas finos com infiltrado linfocitário *brisk* tiveram marcação intensa para CD8+ ($p=0,674$).

5.3.3 Análise do Anticorpo Anti-CD3

5.3.3.1 Amostras Superficiais dos Melanomas Grossos

Nos melanomas grossos, quando feita a contagem de CD3 nas amostras superficiais, os seguintes resultados foram obtidos: 7/20 dos melanomas grossos com TIL *nonbrisk* tiveram marcação escassa para CD3+, enquanto que 13/20 tiveram marcação intensa. A única amostra superficial de melanoma grosso com infiltrado *brisk* teve marcação intensa para CD3+ ($p=1$).

5.3.3.2 Amostras Profundas dos Melanomas Grossos

Quanto à contagem de CD3 em amostras profundas de melanomas grossos, foi dividida em 5/20 sendo de marcação escassa para CD3+ nos casos de TIL *nonbrisk*, enquanto 15/20 dos casos com TIL *nonbrisk* tiveram marcação intensa para CD3+. No único caso de TIL *nonbrisk* a marcação para CD3+ foi escassa ($p=0,286$).

5.3.3.3 Amostras de Melanomas Finos

Nos melanomas finos, a contagem de CD3 após a média dos campos existente em cada amostra ficou em 3/13 *nonbrisk* com marcação escassa e 10/13 *nonbrisk* com marcação intensa. Nos casos *brisk* houve 1/9 casos com marcação escassa para CD3+ e 8/9 com marcação intensa para CD3+ ($p=0,616$).

5.3.4 Análise do Anticorpo Anti-CD20

5.3.4.1 Amostras Superficiais de Melanomas Grossos

Nas amostras superficiais dos melanomas grossos *nonbrisk*, 13/19 casos tiveram marcação escassa para CD20+, enquanto que 6/19 tiveram marcação intensa. No único melanoma grosso com amostra adequada e classificada como *brisk*, a marcação para CD20+ foi escassa ($p=1$).

5.3.4.2 Amostras Profundas de Melanomas Grossos

Na contagem de células coradas com este anticorpo nas amostras profundas dos melanomas grossos foram classificados 15/18 *nonbrisk* com marcação escassa para CD20+, e 3/18 *nonbrisk* com marcação intensa para CD20+; a única amostra com TIL *brisk* teve marcação intensa para CD20+ ($p=0,211$). Um caso não foi avaliado com este anticorpo por inadequabilidade da amostra.

5.3.4.3 Amostras de Melanomas Finos

Nos melanomas finos, a contagem de CD20 foi nos casos *nonbrisk* de 13/13 (100%) com marcação escassa. Nos casos com TIL *brisk* foi 6/9 com marcação escassa e 3/9 com marcação intensa para CD20+ ($p=0,055$).

5.3.5 Análise do Anticorpo Anti-CD25

5.3.5.1 Amostras Superficiais de Melanomas Grossos

Em amostras superficiais de melanomas grossos, a avaliação dos linfócitos marcados com anticorpo anti-CD25 foi para os casos *nonbrisk* de 8/19 com marcação intensa, o que significa que 8 amostras tiveram o CD25+ em número $\geq 1,5$ na média dos campos de cada amostra, enquanto 11/19 tiveram marcação escassa. Para o único caso *brisk* a marcação foi intensa para CD25+ ($p=0,450$).

5.3.5.2 Amostras Profundas de Melanomas Grossos

Para os casos *nonbrisk* dos melanomas grossos, em amostra profunda, a marcação para CD25+ foi intensa em 14/20 casos, enquanto houve marcação escassa para CD25+ em 6/20 casos. Para o único melanoma espesso *brisk* com amostra adequada, o CD25+ teve marcação intensa ($p=1$).

5.3.5.3 Amostras de Melanomas Finos

Nos melanomas finos, 5/13 casos *nonbrisk* tiveram marcação intensa para CD25+, enquanto que 8/13 tiveram marcação escassa. Nos casos *brisk*, 3/9 tiveram marcação intensa e 6/9 tiveram marcação escassa para CD25+ ($p=1$).

5.3.6 Análise do Anticorpo Anti-CD57

Na contagem das células marcadas por anticorpo anti-CD57, conforme já detalhado no método, optou-se em dividir em 2 grupos: um grupo com

contagem ≥ 5 CD57+ (intensa) na média dos campos de cada amostra, e outro grupo com tal contagem < 5 (escassa).

5.3.6.1 Amostras Superficiais de Melanomas Grossos

Para os casos de melanomas grossos, amostra superficial, nos casos *nonbrisk* houve 12/19 com marcação intensa para CD57+, e 7/19 com marcação escassa. O único caso *brisk* teve marcação intensa para CD57+ ($p=1$).

5.3.6.2 Amostras Profundas de Melanomas Grossos

Para as amostras profundas dos melanomas grossos, nos casos *nonbrisk* houve 11/19 com marcação intensa para CD57+, e 8/19 com marcação escassa para tal anticorpo. O único caso *brisk* teve marcação intensa para CD57+ ($p=1$).

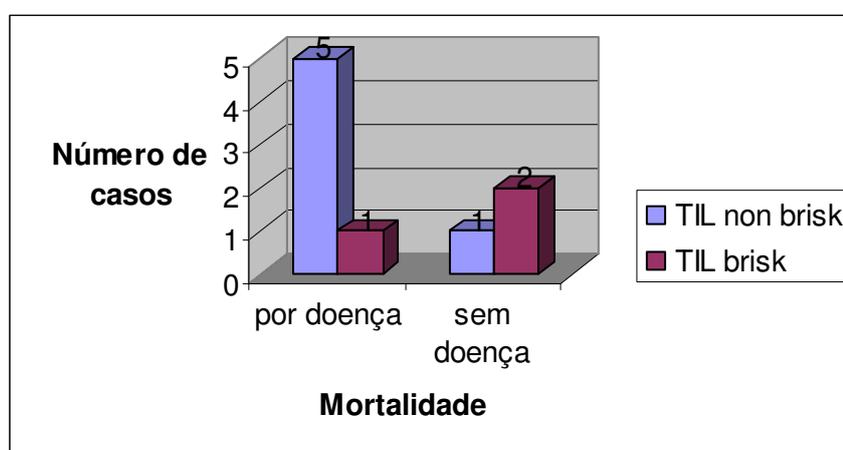
5.3.6.3 Amostras de Melanomas Finos

Nos casos de melanomas finos, o CD57 teve marcação intensa em 9/13 casos *nonbrisk*, e teve marcação escassa em 4/13 casos. Já nos casos com TIL *brisk*, a marcação foi intensa em 9/9 casos (100%) ($p=0,115$).

5.4 SOBREVIDA E EVOLUÇÃO

Houve um total de 9 pacientes mortos avaliáveis no seguimento; destes, 6 morreram por doença e 3 por outras causas; dos 6 casos que morreram por melanoma, 5 apresentavam o TIL *nonbrisk*, e 1 apresentava o TIL *brisk*. Dos 3 casos de óbitos por outras causas 1 era *nonbrisk* e 2 *brisk*.

GRÁFICO 11 – MORTALIDADE X TIL



6 DISCUSSÃO

Apesar de a biologia do melanoma ter sido muito estudada nos últimos 30 anos, seja de um ponto de vista clínico bem como em modelos experimentais animais, ainda se conhece pouco dos eventos moleculares e dos mecanismos implicados na transformação maligna dos melanócitos e na progressão tumoral do melanoma.(VERONESI, 2000).

Recentemente, técnicas avançadas de biologia molecular têm possibilitado a identificação de marcadores moleculares que estão sendo investigados na tentativa de estabelecer uma correlação da sua expressão com os fatores prognósticos atuais, o risco de progressão, metástase e sobrevida dos pacientes com melanoma. Entre os marcadores moleculares envolvidos na patogênese do melanoma estão os reguladores de ciclo celular, componentes apoptóticos e mecanismos de adesão celular (FIGUEIREDO, 2003).

Para avaliar a resposta inflamatória tumoral, há marcadores moleculares de células inflamatórias, como linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Sabe-se que em todas as etapas de crescimento tumoral existe um certo grau de reação linfocitária, mas a correlação entre o grau desta reação e o prognóstico dos melanomas ainda não está bem estabelecida.

6.1 AMBIENTE DO ESTUDO

Os melanomas obtidos para o estudo foram de pacientes operados no Hospital Nossa Senhora das Graças. Os dados clínicos foram obtidos tanto pelos prontuários médicos dos pacientes, como também entrevistando diretamente os médicos cirurgiões que operaram os pacientes, bem como os próprios pacientes.

Os blocos de parafina contendo os tumores foram encaminhados para o

laboratório de Patologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, onde sofreram o processo de microarranjos teciduais para a obtenção das amostras e análise imunohistoquímica dos melanomas. A releitura das lâminas, bem como a classificação do infiltrado linfocitário (TIL) presente nos tumores aconteceu neste laboratório.

A análise imunohistoquímica dos melanomas foi também realizada neste laboratório

Este estudo faz parte da linha de pesquisa: “Patologia da Pele e Métodos Diagnósticos de Ponta”, e um dos ramos desta linha tem como objetivo de verificar a validade e reprodutibilidade de variáveis prognósticas para o melanoma que ainda não fazem parte do novo sistema de estadiamento do melanoma da AJCC (BALCH, C.M. et al., 2001b). Houve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner, visto que o Hospital Nossa Senhora das Graças não possui Comitê de Ética em Pesquisa.

O número de casos (n=43) está de acordo com alguns artigos encontrados na literatura a respeito de análise com microarranjos teciduais de melanoma ou imunohistoquímica em melanoma (GUITARD et al., 2002; LADÁNYI et al., 2004; PIRAS et al., 2005; HUSSEIN et al., 2006).

6.2 VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS DOS PACIENTES

A idade média dos pacientes foi de 62,2 anos, com variação de 37 a 87 anos. A média de idade foi portanto pouco maior que a média de idade de incidência do melanoma na população americana ou australiana, que é em torno de 50 anos de idade (DEVITA et al., 2005). A amostra foi homogênea quanto ao sexo, com 22 homens e 21 mulheres, coincidindo com a população americana com melanoma, a qual é homogênea quanto ao sexo (DEVITA et al., 2005). Em relação à localização tumoral, houve um certo predomínio das lesões de tronco / cabeça e pescoço em relação às de extremidades, como

mostra o gráfico 3; esta distribuição de localização, porém, não teve papel determinante no restante do estudo.

O índice de Breslow foi aferido e verificou-se que em 21 casos era maior que 1mm e em 22 casos foi menor ou igual a 1 mm.

Houve um equilíbrio entre os casos com Breslow menor que 1mm e Breslow maior que 1mm, como mostra o gráfico 4; este equilíbrio não foi intencional, mas foi adequado para o estudo, pois o enfoque foi de pacientes com doença localizada, sem metástases regionais ou à distância, e portanto se conseguiu dividir bem a amostra entre melanomas finos e grossos. Esta classificação veio de trabalhos publicados que estudaram TIL ou imunomarcção em melanoma, que geralmente dividem os pacientes em dois grupos: melanomas finos e melanomas grossos, ou ainda melanomas em fase de crescimento radial e melanoma em fase de crescimento vertical (LARSEN et al., 1978; GUITARD et al., 2002; PIRAS et al., 2005). Para as demais variáveis também procuramos seguir esta linha de divisão binária dos valores, a fim de facilitar a análise estatística.

Em relação às outras variáveis anatomopatológicas como nível de Clark, taxa mitótica, ulceração ou regressão histológica, mostraram um padrão de distribuição não muito diferente ao da população habitual de melanomas não-metastáticos.

O TIL dos melanomas do estudo foi em 73,7% dos casos do tipo *nonbrisk*, como mostra o gráfico 10. O TIL representa a resposta imune às células de melanoma. Esta resposta é usualmente medida pelo nível do TIL presente na base da fase de crescimento vertical do tumor e pode ser caracterizada como *brisk*, *nonbrisk* ou *absent* (ELDER et al., 1985; CLARK et al., 1986), conforme já descrito anteriormente. A maioria do TIL é encontrada em tumores finos (MIHM et al.; 1996), ou em fase de crescimento radial. Os melanomas de nosso estudo estavam divididos de maneira relativamente homogênea entre finos e grossos, o que não justificaria este predomínio

encontrado no TIL *nonbrisk*; porém, não se pode esquecer que há outros fatores envolvidos, além do índice de Breslow, e que podem alterar o tipo do TIL.

Quando o TIL foi cruzado com o sexo dos pacientes, houve nos melanomas dos homens uma relação *nonbrisk / brisk* de 15/3, menor que nos melanomas femininos, onde esta relação foi 18/3. Não houve porém significância estatística neste dado (TABELA 1). Portanto, não se pode tirar qualquer conclusão a respeito de predominância de um ou outro tipo de infiltrado quando cruzado com o gênero dos pacientes.

O TIL também foi avaliado em relação a diferentes faixas etárias para verificar se havia diferença entre a intensidade do TIL e a idade dos pacientes com melanoma, o que poderia indicar que a resposta imune tumoral seria influenciada pela idade. Isso não foi comprovado. Não houve diferença significativa conforme mostra a tabela 1 quando se compara o TIL dos pacientes com até 60 anos de idade e aqueles com mais de 60 anos de idade, sendo que nos dois grupos houve predominância do TIL *nonbrisk*. Não foi encontrado dado na literatura médica que corrobore com alguma relação entre o TIL e a idade dos pacientes com melanoma primário.

Quando o TIL foi confrontado com o sítio do melanoma – localização tumoral -, houve uma tendência de diferença na relação *brisk / nonbrisk* quando se comparam melanomas de cabeça e pescoço ou tronco com melanomas de extremidades. A predominância do TIL *nonbrisk* nos melanomas de cabeça e pescoço ou tronco foi pouco maior que nos melanomas de extremidades, conforme se pode observar na tabela 1. Apesar de não haver dados na literatura que ratifiquem tal informação, estes dados podem sugerir menor resposta linfocitária anti-tumoral nos melanomas de cabeça e pescoço ou tronco, levando em conta as outras variáveis analisadas em conjunto. O fato de haver pouco mais de TIL *brisk* nos melanomas de extremidades poderia favorecer os dados de melhor prognóstico destas lesões quando comparadas

com às de cabeça e pescoço ou tronco, dado observado em vários estudos (SCHUCHTER et al., 1996; MASBACK et al., 2001; SLINGLUFF et al., 1993). Na ausência de doença metastática e para todas as variações de espessura tumoral, uma taxa de sobrevida em 10 anos de 90% foi observada quando o melanoma primário foi nas extremidades, comparado com 70% quando no tronco, cabeça ou pescoço, em estudos supra-citados.

A espessura tumoral (índice de Breslow) e a ulceração são os fatores prognósticos independentes mais poderosos para o melanoma cutâneo localizado (BALCH et al., 2001a; SCHUCHTER et al., 1996; SOONG et al., 1992; BRESLOW et al., 1970). O índice de Breslow é medido em milímetros da camada granular da epiderme até a célula tumoral mais profunda. Aumento da espessura tumoral está associado com sobrevida mais pobre.

Em nossa série, o TIL ia diminuindo conforme o Breslow ia aumentando nos melanomas. Conforme se pode observar na tabela 1, os melanomas grossos tiveram TIL *nonbrisk* em quase a totalidade dos casos, o que não aconteceu com os melanomas finos, em que houve maior equilíbrio entre os tipos de TIL. Esses dados estão de acordo com estudos que encontraram relação inversa entre densidade do TIL e profundidade da invasão tumoral (LARSEN et al., 1978; MIHM et al., 1996).

O nível de Clark tem sido usado para descrever o envolvimento do tumor dentro das estruturas cutâneas e subcutâneas. Ele é mais preditor de sobrevida em melanomas finos (<1mm), e é parte do sistema de estadiamento somente em tais lesões (BALCH et al., 2004). Em nossa série, não se observou mudança no padrão de TIL conforme o nível de Clark (tabela 1). Houve um predomínio homogêneo do infiltrado *nonbrisk* tanto no grupo de melanomas com Clark II como no grupo com Clark maior que II. Houve nestes dados significância estatística, em análise multivariada ($p=0,036$). Na literatura encontramos somente um trabalho, de LARSEN et. col., que correlaciona a densidade do TIL com o índice de Clark, encontrando TIL *nonbrisk* nos tumores

com Clark acima de III. Estes dados podem ter sido encontrados neste trabalho pois os tumores com Clark acima de III geralmente são mais grossos, e sendo assim teriam relação com um TIL menos denso. No restante da revisão bibliográfica não encontramos nenhum outro dado que correlacione o nível Clark com o padrão de TIL.

Nos melanomas com maior taxa mitótica (mais que 4 mitoses em 10 CGA) de nossa série, que poderiam ser considerados de mais agressividade, a predominância do TIL *nonbrisk* foi maior do que aquela vista nos tumores com menor taxa mitótica (4 ou menos mitoses em 10 CGA), conforme se pode observar na tabela 1. Porém, este dado não se acompanhou de significância estatística, nem mesmo para indicar uma tendência. Na literatura também não encontram-se dados que indiquem mudança do padrão de TIL de acordo com a taxa mitótica nos melanomas.

Avaliando a ulceração em comparação com o TIL, houve uma tendência de diferença entre os melanomas ulcerados e os sem ulceração no que se refere ao padrão do TIL. Nos ulcerados o TIL foi considerado em 100% deles como *nonbrisk*, enquanto que nos melanomas sem ulceração este predomínio não ocorreu como se observa na tabela 1. Como já mencionado, as duas características prognósticas independentes mais poderosas do melanoma cutâneo primário são ulceração (que não estava presente no sistema de estadiamento antigo) e espessura tumoral. Estes fatores são altamente relacionados entre si. Estudos têm mostrado que a incidência de ulceração no melanoma cresce com o aumento da espessura tumoral, variando de 6-12% para melanomas delgados a 63%-72,5% para lesões grossas (>4mm) (BALCH et al., 2001a; BALCH et al., 1980). Não há estudo específico correlacionando o TIL com a ulceração, na literatura, mas como a ulceração está diretamente relacionada com o Breslow, e este sim tem relação inversa com a densidade do TIL, os achados de ausência de TIL *brisk* nos melanomas ulcerados de nossa série estariam coerentes com a distribuição habitual do TIL nos melanomas

mais grossos, e poderiam também indicar que a perda da cobertura epidérmica nestes casos estaria relacionada a uma menor resposta imune tumoral.

O padrão do TIL foi também comparado com a presença ou não de regressão histológica, como demonstrado na tabela 1. A distribuição do TIL se mostrou semelhante tanto no grupo de melanomas com regressão histológica como no grupo de melanomas sem regressão. Houve um predomínio do TIL *nonbrisk* nos dois grupos, com cerca de 70% dos casos nos melanomas com regressão e 80% nos melanomas sem regressão. Estes dados não tiveram significância estatística; somente uma tendência na análise multivariada.

Regressão é a substituição do tecido tumoral por fibrose, células de melanoma degeneradas, proliferação linfocítica e telangiectasias (ZETTERSTEN et al., 2003). Apesar de a maioria dos estudos não terem encontrado um papel significativo para regressão em determinar sobrevida, um estudo mostrou que regressão é fator prognóstico adverso em prever sobrevida em melanomas delgados (SLINGLUFF et al., 1988). Ainda faltam estudos para definição de regressão como fator preditor de prognóstico nos melanomas. MASSI et al. registraram que, em melanomas finos (< 1,0mm), o parâmetro quantitativo da espessura do tumor e a espessura da regressão são importantes fatores independentes preditivos de progressão, ou seja, melanomas finos em pacientes com evolução desfavorável podem ser finos em virtude da regressão, podendo ter sido mais espessos no passado. Em nossa série, o aumento relativo do TIL *brisk* nos melanomas com regressão histológica poderia estar relacionado ao processo inflamatório causador da regressão. Não há dados de literatura porém que ratifiquem esta inferência.

Não houve correlação das satelitoses microscópicas com o padrão do TIL em nossa série. Satelitoses microscópicas são ninhos discretos de tumor maiores que 0,05mm de diâmetro que são separados do corpo do tumor por colágeno normal reticular ou gordura subcutânea. Apesar de serem raras em tumores menores que 1,5mm, quando estiveram presentes a sobrevida foi de

36% comparada a 89% para aqueles sem satelitoses microscópicas (DAY et al., 1981). O número de melanomas com satelitose foi muito baixo, somente 2 casos, em nossa série, e estes dois casos tinham o TIL *nonbrisk*.

6.3 CORRELAÇÃO DO TIL COM AS VARIÁVEIS IMUNOHISTOQUÍMICAS

Os linfócitos exercem um papel central providenciando a especificidade do reconhecimento imune. Inúmeros trabalhos ao longo dos anos estabeleceram que a imunidade celular – aquela exercida pelos linfócitos T – é particularmente relevante para a imunologia tumoral (JANEWAW et al., 2002; DIEFENBACH et al., 2002).

Há marcadores específicos baseados na reatividade a anticorpos, que foram identificados e permitem detectar células T individuais, com um particular estágio de maturação (ZOLA et al., 2006). Os marcadores são moléculas de superfície celular. Por exemplo, o complexo TCR/CD3 é agora comumente utilizado como marcador de células T.

Em nosso estudo, após a correlação do TIL com as variáveis clínicas, foi feito o cruzamento do TIL com as variáveis imunohistoquímicas, ou seja, com a contagem de linfócitos marcados com CD3, CD20, CD4, CD8, CD25 e CD57.

É importante saber que nos casos de melanomas grossos foram feitas 2 amostras por caso, uma sendo mais superficial e outra sendo mais profunda, para garantir uma amostra mais abrangente nestes tumores.

A adequabilidade das amostras foi avaliada de acordo com a quantidade de tecido obtida pelos cortes nos microarranjos. Em nossa série os casos inelegíveis pela análise imunohistoquímica por inadequabilidade das amostras foram muito poucos.

Quando se compara a densidade do TIL com os subtipos de linfócitos presentes no TIL de acordo com os anticorpos utilizados na imunohistoquímica,

o que se busca é uma correlação entre a quantidade e a qualidade do TIL, que poderia variar de acordo com as outras variáveis clínicas ou anatomopatológicas individuais do melanoma.

Das 20 amostras superficiais adequadas nos melanomas grossos corados com anticorpo anti-CD4, 19 tiveram TIL *nonbrisk* e 1 somente com TIL *brisk*. Quase a totalidade das amostras com TIL *nonbrisk* tiveram a contagem de CD4 intensa; porém não houve significância estatística. Não há dado na literatura que possa ser usado como comparação. Já nas 21 amostras profundas dos mesmos melanomas grossos marcadas com o mesmo anticorpo para CD4, 20 amostras tiveram o TIL *nonbrisk*, e destas 19 tiveram marcação para CD4+ escassa. Também não foi estatisticamente significativo. Houve uma mudança, portanto, do montante de CD4+ nos melanomas grossos conforme se aprofundou a região amostrada em relação à espessura da lesão. Não houve significância estatística, mas estas informações poderiam sugerir que o comportamento biológico do TIL pode não ser uniforme para um mesmo melanoma, motivo de estudos de YAZDI et al. (2006).

Interessantemente, nos melanomas finos, o TIL foi homogêneo em relação à densidade, tendo número não muito discrepante de *brisk* ou *nonbrisk* (relação de 13 *brisk* para 8 *nonbrisk*). A distribuição entre marcação escassa e intensa de CD4+ foi homogênea nos tumores *nonbrisk*, com predomínio de contagem escassa de CD4 nos tumores com TIL *brisk*, conforme se observa na tabela 2. Isto poderia sugerir que quanto mais denso é o TIL nos melanomas finos, menor é a proporção de linfócitos CD4+; porém, na literatura não foi encontrada informação que corrobore com estes achados.

Nos melanomas grossos, amostra superficial, a avaliação dos linfócitos quanto ao CD8 foi bem distribuída entre marcação escassa e intensa, conforme se observa na tabela 2. Nas amostras profundas dos melanomas grossos, com TIL *nonbrisk*, houve mais marcação de CD8+ intensa do que escassa, mas sem significância estatística. Pode se observar este padrão de distribuição na

tabela 2.

Nos melanomas finos, a contagem intensa de linfócitos positivos para CD8 foi discretamente maior quando o TIL era *nonbrisk*; já quando o TIL era *brisk* esta diferença foi maior, conforme se observa na tabela 2. Não houve significância estatística nestes achados.

Para estabelecer valor prognóstico das células do sistema imune que infiltram o melanoma, PIRAS et al. (2005) avaliaram a distribuição e densidade de subtipos de linfócitos T, macrófagos e células dendríticas em amostras de melanoma cutâneo primário de 47 pacientes com melanoma estágio I e II de acordo com o sistema de estadiamento da AJCC. Realizaram uma avaliação quantitativa de células CD8, CD4, CD68 e HLA-DR em áreas selecionadas da base do melanoma em fase de crescimento vertical. Quando possível, estas células foram contadas e os valores médios foram correlacionados com sobrevida em uma análise estatística. O diagnóstico de melanoma das lesões foi morfológico e fenotípico, analisando presença de antígenos associados ao melanoma, como proteína S-100, melan A e HMB-45. Foram contadas as células CD8+ na base da fase de crescimento vertical dos melanomas, perto da derme, e classificados os tumores em grupos de alto, moderados e baixo nível de linfócitos. É interessante notar que houve uma diferença significativa de sobrevida em 5 anos entre os indivíduos dos grupos de alta (78,8% de sobrevida), moderada (44,4% de sobrevida) e baixa (25% de sobrevida) densidade de linfócitos T CD8 nas séries de melanoma, sem qualquer relação com outras variáveis clínicas. Estes achados implicariam que a presença de infiltração linfocitária por linfócitos CD8+ pode ser um importante fator prognóstico independente. A presença de mais de 100 linfócitos CD8 aumentaria a taxa de sobrevida significativamente e levaria a um melhor prognóstico, confirmando a atividade antitumoral dos linfócitos T no melanoma.

Observamos neste nosso estudo que, quando interpomos os dados de CD4 e CD8 para o TIL *nonbrisk* a contagem de linfócitos CD4 é predominante

em relação aos linfócitos CD8 nas amostras superficiais dos melanomas grossos. Já para os mesmos melanomas grossos em sua amostra profunda, a mesma relação CD4/CD8 se inverteu e a contagem de CD8 foi superior. Isso é, quando se aprofundou a amostra nos melanomas grossos diminuíram os linfócitos CD4 auxiliares e aumentaram os linfócitos CD8 citotóxicos. Quanto aos melanomas finos, não houve diferenças marcantes nas relações CD4/CD8 tanto nos TIL *nonbrisk* como nos TIL *brisk*. Estas informações poderiam sugerir que em um mesmo melanoma, em regiões distintas, a distribuição das subpopulações de TIL não é uniforme.

O comportamento biológico do TIL pode não ser uniforme para um mesmo melanoma. Pensando nesta hipótese, YAZDI et al. (2006) estudaram 56 melanomas cutâneos primários utilizando uma técnica de microdissecção com captura a laser para isolar diferentes classes de TIL objetivando determinar quando o melanoma primário era infiltrado somente por um simples clone ou quando os antígenos associados ao tumor poderiam atrair várias populações de células T. Como a clonalidade do receptor de células T (TCR) é um instrumento útil para demonstrar a clonalidade de células T, foram analisadas as lesões quanto a rearranjos do gene de cadeia γ TCR. Evidenciaram diferentes clones de células T em várias regiões de um mesmo melanoma primário. Seus resultados trouxeram uma nova luz no paradoxo de como pode haver diferentes TILs tanto em áreas de regressão tumoral como em áreas de progressão tumoral de um mesmo melanoma maligno (THOR STRATEN et al., 2000). Como foi previamente mostrado que diferentes populações de células T têm diferentes efeitos no crescimento tumoral (EGETER et al., 2000; MOCIKAT et al., 2003), os dados obtidos por YAZDI et al. (2006) sugerem que diferentes tipos de TIL podem tanto inibir como promover o crescimento do melanoma em diferentes áreas do tumor.

Tanto os melanomas grossos como os melanomas finos tiveram contagem intensa de linfócitos marcados com anticorpos anti-CD3, que é

considerado um pan-marcador de células T. Não se obteve diferença significativa nas contagens de células CD3+ quando comparados nos TILs *brisk* e *nonbrisk* dos melanomas grossos (TABELA 2). Nos melanomas finos o padrão de contagem alta de linfócitos CD3 se manteve (TABELA 2).

A contagem escassa das células marcadas com o anticorpo anti-CD20 foi predominante tanto nos melanomas grossos como nos finos. Nos melanomas finos houve uma tendência na predominância de contagem escassa de linfócitos CD20+ nos casos *nonbrisk* em relação aos casos *brisk*, como se observa na tabela 2.

Percebe-se, observando a tabela 2, que a contagem dos linfócitos CD3+ nas amostras foi de maneira geral maior que a contagem dos CD20+. Estes achados fortalecem a idéia do predomínio dos linfócitos T no TIL dos melanomas cutâneos.

Os linfócitos exercem um papel central providenciando a especificidade do reconhecimento imune. Inúmeros trabalhos ao longo dos anos estabeleceram que a imunidade celular – aquela exercida pelos linfócitos T – é particularmente relevante para a imunologia tumoral (JANEWAW et al., 2002; DIEFENBACH et al., 2002). HUSSEIN et al. (2006) observou uma preponderância de células T em relação a células B nos TIL de sua série de 76 lesões melanocíticas. Observando em nosso estudo a qualidade da distribuição dos subtipos de linfócitos quanto à marcação com o CD3 e CD20, deduzimos que as células CD3+ estão em maior número em relação às CD20+ (linfócitos B), isto é, no nosso estudo a resposta imune celular foi mais presente que a humoral.

O CD25 também foi testado para representar uma subpopulação de células T que expressa receptores de alta afinidade a IL-2. A contagem das células CD25+ nas amostras foi constantemente baixa, e distribuiu-se quase homogeneamente nas amostras superficiais dos melanomas grossos (TABELA 2). Nas amostras profundas dos mesmos melanomas grossos, encontrou-se

predominância de contagem intensa de CD25+, conforme mostra a tabela 2. Nos melanomas finos, as células CD25+ tiveram sua contagem média tendendo sempre a escassa tanto no *brisk* como no infiltrado *nonbrisk*. Os dados obtidos em relação à marcação com CD25 mostram que realmente estas células estavam presentes no TIL dos melanomas estudados, e devem desempenhar seu papel na resposta inflamatória tumoral contra estes melanomas, principalmente nos melanomas grossos (amostras profundas).

Foi avaliada também a marcação com anticorpo anti-CD57, o que representaria as células *natural killer* do TIL. Sua contagem foi pouco maior que a média da células CD25. Nos melanomas grossos, nas amostras superficial e profunda, houve um maior número de amostras com contagem intensa de CD57. Nos melanomas finos, tanto no infiltrado *brisk* como no infiltrado *nonbrisk*, a contagem de CD57 dominante também foi a mais intensa, conforme se pode observar na tabela 2. Estes dados mostram a presença do linfócito CD57 no TIL dos melanomas, e sugerem que quanto mais fino o melanoma maior é a contagem deste subtipo de linfócito com ação de *natural killer*.

6.4 SOBREVIDA E EVOLUÇÃO

O gráfico 11 mostra a mortalidade dos pacientes de nossa série. Dos 9 pacientes mortos avaliáveis no seguimento, 6 morreram por melanoma e 3 por outras causas. O TIL dos que morreram foi *nonbrisk* em 5 casos e *brisk* em 1 caso. Dos 3 casos de óbitos por outras causas 1 tinha TIL do tipo *nonbrisk* e 2 tinham o TIL *brisk*. Estes dados não possuem valor estatístico, mas vão de acordo com a idéia de que o infiltrado *nonbrisk* poderia representar uma diminuição não somente da quantidade mas também da qualidade da defesa imune contra o melanoma, podendo representar que o indivíduo está menos protegido contra o melanoma.

Este trabalho, realizado com melanomas de pacientes operados no Hospital Nossa Senhora das Graças de Curitiba-Pr, analisados no laboratório de Patologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, utilizou recursos de Anatomia Patológica que vão desde a simples análise morfológica até microarranjos teciduais com análise molecular das células que compõem o TIL dos melanomas. Seu direcionamento reforça a idéia de que o comportamento biológico do melanoma pode aos poucos ser mais conhecido, o que irá auxiliar na definição do prognóstico dos pacientes, na avaliação da sua resposta aos tratamentos existentes, bem como na obtenção de novas terapias, como as vacinas, que poderão trazer luz ao prognóstico sombrio de muitos pacientes.

7 CONCLUSÃO

a) Houve predomínio do TIL do tipo *nonbrisk* nos melanomas de nossa série.

b) A predominância do TIL *nonbrisk* nos melanomas de cabeça e pescoço ou tronco foi pouco maior que nos melanomas de extremidades ($p < 0,05$).

c) Os melanomas grossos tiveram infiltrado linfocitário *nonbrisk* em quase a totalidade dos casos, o que não aconteceu com os melanomas finos ($p < 0,05$).

d) Não se observou mudança no padrão do TIL conforme o nível de Clark.

e) A predominância do TIL *nonbrisk* foi maior nos tumores de alta taxa mitótica quando comparada aos tumores com menor taxa mitótica ($p > 0,05$).

f) Nos melanomas ulcerados o TIL foi *nonbrisk* em 100% dos casos, enquanto que nos melanomas sem ulceração este predomínio não ocorreu ($p > 0,05$).

g) Houve um predomínio do TIL *nonbrisk* em cerca de 70% dos casos nos melanomas com regressão e 80% nos melanomas sem regressão ($p > 0,05$).

h) Houve um aumento na contagem da subpopulação de linfócitos CD4+ no TIL dos melanomas grossos de nossa série conforme se aprofundou a

região amostrada em relação à espessura da lesão, ou seja, mudança no padrão do TIL em relação à presença de linfócitos CD4 conforme a localização tumoral ou peritumoral ($p>0,05$).

i) Nos melanomas finos, a contagem intensa de linfócitos positivos para CD8 foi discretamente maior nas amostras com TIL *nonbrisk*; já nas amostras com TIL do tipo *brisk* esta diferença foi maior ($p>0,05$).

j) Tanto os melanomas grossos como os melanomas finos tiveram contagem intensa de linfócitos marcados com anticorpos anti-CD3.

k) A contagem das células marcadas com o anticorpo anti-CD20 foi predominantemente escassa nos melanomas grossos e finos.

l) Nos melanomas finos, os casos *nonbrisk* apresentaram maior predomínio de contagem escassa de linfócitos CD20+ ($p>0,05$).

m) A contagem dos linfócitos CD3+ foi maior que a contagem dos linfócitos CD20+.

n) A contagem de linfócitos marcados com anticorpo anti-CD25 foi constantemente escassa ($p>0,05$).

o) A contagem dos linfócitos marcados com anticorpo anti-CD57 foi maior que aquela dos linfócitos CD25+.

p) Nos melanomas finos, a contagem de CD57 predominante foi a intensa ($p>0,05$). Isto sugere que quanto mais fino o melanoma maior é a contagem deste subtipo de linfócito com ação de *natural killer*.

REFEFÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v.383, n.6603, p.787-793, 1996.
- ABBOTT, J.J.; AMIRKHAN, R.H.; HOANG, M.P. Malignant melanoma with a rhabdoid phenotype: histologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of a case and review of the literature. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.128:686-688, 2004.
- ARUGA, A.; SHU, S.; CHANG, A.E. Tumor-specific granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interferon gamma secretion is associated with in vivo therapeutic efficacy of activated tumor draining lymph node cells. **Cancer Immunol. Immunother.**, v.41:317-324, 1995.
- BALCH, C.M.; WILKERSON, J.A.; MURAD, T.M. et al. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. **Cancer**, v.45:3012-3017, 1980.
- BALCH, C.M. Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. **Semin. Surg. Oncol.**, v.8:400-414, 1992.
- BALCH, C.M.; BUZAID, A.C.; ATKINS, M.B. et al. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. **Cancer**, v.88:1484-1491, 2000.
- BALCH, C.M. et al. Prognostic factors analysis of 17.600 melanoma patients: validation of the *American Joint Committee on Cancer* melanoma staging system. **J. Clin. Oncol.**, v.19:3622-3634, 2001a.
- BALCH, C.M. et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. **J. Clin. Oncol.**, v.19:3635-3648, 2001b.
- BALCH, C.M.; SOONG, S.J.; ATKINS, M.B. et al. An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. **CA Cancer J. Clin.**, v.54:131-149, 2004.
- BARBOUR, A.H.; COVENTRY, B.J. Dendritic cell density and activation status of tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic human melanoma: possible implications for sentinel node metastases. **Melanoma Res.**, v.13:263-269, 2003.
- BARTH, A.; WANEK, L.A.; MORTON, D.L. Prognostic factors in 1521 melanoma patients with distant metastases. **J. Am. Coll. Surg.**, v.181:193-201, 1995.

BARTH, R.J.; MULE, J.J.; SPIESS, P.J. et al. Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v.173, n.3, p.647-658.

BERKE, G. The CTL's kiss of death. **Cell**, v.81, n.1, p.9-12, 1995.

BITTNER, M.; MELTZER, P.; CHEN, Y. et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. **Nature**, v.406:536-540, 2000.

BJORKMAN, P.J.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B. et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. **Nature**, v.329, p.506-512, 1987.

BJORKMAN, P.J.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B. et al. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. **Nature**, v.329, p.512-518, 1987.

BOSSERHOFF, A.K. Novel biomarkers in malignant melanoma. **Clin. Chim. Acta**, v.367, n.1-2:28-35, 2006.

BRESLOW, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. **Ann. Surg.**, v.172:902-908, 1970.

BROCKER, E.B.; ZWADLO, G.; HOLZMANN, B.; MACHER, E.; SORG, C. Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression. **Int. J. Cancer**, v.41, n.4, p.562-567, 1988.

BROSE, M.S.; VOLPE, P.; FELDMAN, M. et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. **Cancer Res.**, v.62:6997-7000, 2002.

BUSAM, K.J.; ANTONESCU, C.R.; MARGHOOB, A.A.; NEHAL, K.S.; SACHS, D.L.; SHIA, J.; BERWICK, M. Histologic classification of tumor infiltrating lymphocytes in primary cutaneous malignant melanoma. A study of interobserver agreement. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.115, n.6, p.856-860, 2001.

BUZAID, A.C.; ROSS, M.I.; BALCH, C.M. et al. Critical analysis of the current American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system. **J. Clin. Oncol.**, v.15:1039-1051, 1997.

CAMP, R.L.; CHARETTE, L.A.; RIMM, D.L. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. **Lab. Invest.**, 2000, v.80, n.12:1943-1949, 2000.

CAMPOLI, M.; CHANG, C.C.; FERRONE, S. HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. **Vaccine**, v.20 [Suppl 4], p.A40-A45, 2002.

CARTER, L.L.; SWAIN, S.L. Single cell analysis of cytokine production. **Curr. Opin. Immunol.**, v.9, n.2, p.177-82, 1997.

CHANG, C.K.; JACOBS, I.A.; VIZGIRDA, V.M. et al. Melanoma nos pacientes idosos. **Arch. Surg.**, v.138:1135-1138, 2003.

CLARK, W.H. Jr. et al. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum. Pathol.**, v.15:1147-1165, 1984.

CLARK, W.H. Jr., ELDER, D.E., VAN HORN, M. The biologic forms of malignant melanoma. **Hum. Pathol.**, v.17:443-50, 1986.

CLARK, W.H.; ELDER, D.E. et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.81, n.24, p.1893-1904, 1989.

CLEMENTE, C.G.; MIHM, M.C. et al. Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. **Cancer**, v.77, n.7, p.1303-1310, 1996.

COLE, D.J.; TAUBENBERGER, J.K.; POCKAJ, B.A. et al. Histopathological analysis of metastatic melanoma deposits in patients receiving adoptive immunotherapy with tumor-infiltrating lymphocytes. **Cancer Immunol. Immunother.**, v.38:299-303, 1994.

CONSTANT, S.L.; BOTTOMLY, K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternatives approaches. **Annu. Rev. Immunol.**, v.15, p.297-322, 1997.

CRISPE, I.N. Fatal interactions: Fas-induced apoptosis of mature T cells. **Immunity**, v.1, n.5, p.347-349, 1994.

DADRAS, S.S.; PAUL, T.; BERTONCINI, J. et al. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. **Am. J. Pathol.**, v.162:1951-1960, 2003.

DAY, C.L.; HARRIST, T.J.; GORSTEIN, F. et al. Malignant melanoma. Prognostic significance of "microscopic satellites" in the reticular dermis and subcutaneous fat. **Ann. Surg.**, v.194:108-112, 1981.

DAVIES, H.; BIGNELL, G.R.; COX, C. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v.417: 949-954, 2002.

DESSUREAULT, S.; SOONG, S.J.; ROSS, M.I. et al. Improved staging of node negative patients with intermediate to thick melanomas (<1mm) with the use of lymphatic mapping and sentinel lymphnode biopsy. **Ann. Surg. Oncol.**, v.8:766-770, 2001. Erratum in: **Ann. Surg. Oncol.**, v.9:318, 2002.

DEVITA JR., V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **CANCER Principles & Practice of Oncology**, ed. Lippincott Williams & Wilkins, 7th edition, 2005.

DIEFENBACH, A.; RAULET, D.H. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. **Immunol. Rev.**, v.188:9-21,2002.

DOS SANTOS, N.R.; TORENSMA, R.; DE VRIES, T.J. et al. Heterogeneous expression of the SSX câncer/testis antigens in human melanoma lesions and cell lines. **Cancer Res.**, v.60, 1654-1662, 2000.

ELDER, D.E.; GUERRY, D. IV; VANHORN, M. et al. The role of lymph node dissection for clinical stage I malignant melanoma of intermediate thickness (1.51-3.99 mm). **Cancer**, v.56:413-418, 1985.

EGETER, O.; MOCIKAT, R.; GHORESCHI, K.; DIECKMENN, A.; ROCKEN, M. Eradication of disseminated lymphomas with Cp-G-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice. **Cancer Res.**, v.60:1515-1520, 2000.

FIGUEIREDO, L.C.; CORDEIRO, L.N.; ARRUDA, A.P. et al. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Revista Bras. Cancerologia**, v.49, n.3:179-183, 2003.

FITCH, F.W.; MCKISIC, M.D.; LANCKI, D.W. et al. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. **Annu. Rev. Immunol.**, v.11, p.29-98, 1993.

FRANCKEN, A.B.; SHAW, H.M.; THOMPSON, J.F.; SOONG, S-J.; ACCORTT, N.A.; AZZOLA, M.F.; SCOLYER, R.A.; MILTON, G.W.; MCCARTHY, W.H.; COLMAN, M.H.; MCGOVERN, V.J. The prognostic importance of tumor mitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous melanoma and long follow-up. **Ann. Surg. Oncol.**, v.11:426-433, 2004.

FRITSCH, M.; ROSENBERG, S.A.; DURAY, P.H. Immunohistologic responses within dermal metastatic melanoma lesions of patients treated with a synthetic peptide vaccine. **J. Immunother.**, v.23:557-69, 2000.

GARCIA-LORA, A.; ALGARRA, I.; GARRIDO, F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. **J. Cell Physiol.**, v.195, n.3, p.346-355, 2003.

GENSHENWALD, J.E.; THOMPSON, W.; MANSFIELD, P.F. et al. Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. **J. Clin. Oncol.**, v.17:976-983, 1999.

GILCHREST, B. Anti-sunshine vitamin A. **Nat. Med.** v. 5:376-377, 1999.

GOLDRATH, A.W.; BEVAN, M.J. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. **Nature**, v.402, n.6759, p.255-262, 1999.

GUITARD, J. et al. Histological characteristics of metastasizing thin melanomas: a case-control study of 43 cases. **Arch. Dermatol.**, v.138, n.5, p.603-608, 2002.

HANASH, S. Disease proteomics. **Nature**, v.422, n.6928, p.226-232, 2003.

HARRIST, T.J.; RIGEL, D.S.; DAY, C.L. et al. "Microscopic satellites" are more highly associated with regional lymph node metastases than is primary melanoma thickness. **Cancer**, v.53:2183-2187, 1984.

HENKART, P.A. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. **Immunity**, v.1, n.5, p.343-346, 1994.

HENKART, P.A.; SITKOVSKY, M.V. Cytotoxic T-lymphocytes. In Paul WE, ed. **Fundamental Immunology**, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.1127, 2003.

HOEK, K.; RIMM, D.L.; WILLIAMS, K.R. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. **Cancer Res.**, v.64: 5270-5282, 2004.

HOMSI, J.; KASHANI-SABET, M.; JANE, L. Cutaneous melanoma: prognostic factors. **Cancer Control**, San Francisco, v.12, n.4, p.223-229, 2005.

HOOS, A.; URIST, M.J.; STOJADINOVIC, A.; MASTORIDES, S.; DUDAS, M.E.; LEUNG, D.H. et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. **Am. J. Pathol.**, v.158, n.4:1245-1251, 2001.

HUBALEWSKA, A.; SOWA-STASZCZAK, A.; HUSZNO, B. et al. Use of Tc99mnanocolloid for sentinel nodes identification in cervical cancer. **Nucl. Med. Rev. Cent. East. Eur.**, v.6:127-130, 2003.

HUSSEIN, M.R.; ELSERS, D.A.H.; FADEL, S.A.; OMAR, A-E.M. Immunohistological characterisation of tumor-infiltrating lymphocytes in melanocytic skin lesions. **J. Clin. Pathol.**, v.59, n.3:316-324, 2006.

INCA - Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Câncer de pele: Melanoma. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/conteudo> Acesso em: 20 nov. 2006.

ITOH, K.; PLATSOUKAS, D.C.; BALCH, C.M. Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas: activation by interleukin 2 and autologous tumor cells and involvement of the T cell receptor. **J. Exp. Med.**, v.168, n.4:1419-1441, 1988.

JANEWAY, C.A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v.20:197-216, 2002.

KANG, X.; KAWAKAMI, Y.; EL-GAMIL, M. et al. Identification of a tyrosinase epitope recognized by HLA-A24-restricted, tumor-infiltrating lymphocytes. **J. Immunol.**, v.155:1343-1348, 1995.

KASHANI-SABET, M.; SABEGIEL, R.W.; FERREIRA, C.M. et al. Vascular involvement in the prognosis of primary cutaneous melanoma. **Arch. Dermatol.**, v.137:1169-1173, 2001.

KASHANI-SABET, M.; SAGEBIEL, R.W.; FERREIRA, C.M. et al. Tumor vascularity in the prognostic assesstment of primary cutaneous melanoma. **J. Clin. Oncol.**, v.20:1826-1831, 2002.

KASHANI-SABET, M.; SHAIKH, L.; MILLER, J.R. III et al. NF-kappa B in the vascular progression of melanoma. **J. Clin. Oncol.**, v.22:617-623, 2004.

KHONG, H.T.; RESTIFO, N.P. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. **Nat. Immunol.**, v.2, n.11, p.999-1005, 2002.

KOJIMA, H.; SHINOHARA, N.; HANAOKA, S. et al. Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes. **Immunity**, v.1, n.5, p.357-364, 1994.

KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat. Med.**, v.4, n.7:844-847, 1998.

KOUTSKY, L.A.; AULT, K.A.; WHEELER, C.M. et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. **N. Engl. J. Med.**, v.347, n.21, p.1645-1651, 2002.

LADÁNYI, A. et al. T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 10, n.2, p.521-530, 2004.

LANIER, L.L.; PHILLIPS, J.H. Natural killer cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v.4, n.1, p.38-42, 1992.

LARSEN, T.E.; GRUDE, T.H. A retrospective histological study of 669 cases of primary cutaneous malignant melanoma in clinical stage I. The relation between the tumor-associated lymphocyte infiltration and tumor age and sex, tumor cell type, pigmentation, cellular atyia, mitotic count, depth of invasion, ulceration, tumor type and prognosis. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v.86A, n.6, p.523-530, 1978.

LEHMANN, J.M.; RIETHMÜLLER, G.; JOHNSON, J.P. Muc 18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V.86:9891-9895, 1989.

LEITER, U.; BUETTNER, P.G., EIGENTLER, T.K. et al. Prognostic factor of thin cutaneous melanoma: an analysis of the central malignant melanoma registry of the German Dermatological Society. **J. Clin. Oncol.**, v.22:3660-3667, 2004.

LUFTL, M.; SCHULER, G.; JUNGBLUTH, A.A. Melanoma or not? Cancer testis antigens may help. **Br. J. Dermatol.**, v.151:1213-1218, 2004.

MANGINI, J.; LI, N.; BHAWAN, J. Immunohistochemical Markers of melanocytic lesions: a review of their diagnostic usefulness. **Am. J. Dermatopathol.**, v.24, n.3:270-281, 2002.

MARCOVAL, J; MORENO, A./ GRAELLS, J. et al. Vascular density and survival in cutaneous melanoma. **Br. J. Dermatol.**, v.134:809-810, 1996.

MARCOVAL, J.; MORENO, A.; GRAELLS, J. et al. Angiogenesis and malignant melanoma: angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth phase. **J. Cutan. Pathol.**, v.24:212-218, 1997.

MARIA, D.A. Biologia das Respostas Imunes Inespecíficas e Específicas em Tumores Cutâneos. **Boletim Informativo do GBM**, ano V, n.9, 2002.

MARINCOLA, F.M.; JAFFE, E.M.; HICKLIN, D.J. et al. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. **Adv. Immunol.**, v.74, p.181-273, 2000.

MARKS, R.. Epidemiology of melanoma. **Clin. Exp. Dermatol.** v.25:459-463, 2000.

MARKUS, N.R.; ROSENBERG, S.A.; TOPALIAN, S.L. Analysis of cytokine secretion by melanoma-specific CD4+ T lymphocytes. **J. Interferon Cytokine Res.**, v.15:739-746, 1995.

MASBACK, A.; OLSSON, H.; WESTERDAHL, J. et al. Prognostic factors in invasive cutaneous malignant melanoma: a population-based study and review. **Melanoma Res.**, v.11:435-445, 2001.

MASSI, D.; FRANCHI, A.; BORGOGNONI, L.; REALI, U.M.; SANTUCCI, M. Thin cutaneous malignant melanoma (< or = 1,5mm): identification of risk factors indicative of progression. **Cancer**, v.85:1067-76, 1999.

MATSUDA, M.; PETERSON, M.; LENKEI, R. et al. Alterations in the signal-transducing molecules of T cells and NK cells in colorectal tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: correlation with the stage of the disease. **Int. J. Cancer**, v.61:765-72, 1995.

MCGOVERN, V.J.; SHAW, H.M.; MILTON, G.W. Prognosis in patients with thin malignant melanoma: influence of regression. **Histopathology**, v.7:673-680, 1983.

MEIER, F. et al. Molecular events in melanoma development and progression. **Front. Biosci.**, v.3:D1005-D1010, 1998.

MIHM, M.C.; CLEMENTE, C.G.; CASCINELLI, N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic

indicator and na expression of local immune response. **Lab. Invest.**, v.74, n.1,p.43-47, 1996.

MIHM, M.C. Tumor infiltrating lymphocytes in melanoma: history, current status and future approaches. **Cancer Immunossurveillance**, 1999. Disponível em : <http://www.cancerresearch.org/immune99/martin-mihm.html> Acesso em 19 nov 2006.

MILLS, S.E.; KEMPSON, R.L.; FECHNER, R.E.; FRIERGSON, H.F. JR.; WICK, M.R.; DEHNER, L.P. et al. Guardians of the wax...and the patient. **Mod. Pathol.**, v.8, n.7:699-700, 1995.

MOCIKAT, R.; BRAUMULLER, H.; GUMY, A.; EGETER, O.; ZIEGLER, H.; REUSCH, U. et al. Natural killer cells activated by MHC class I (low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8T cell responses. **Immunity**, v.19:561-569, 2003.

MORISAKI, T.; MORTON, D.L.; UCHIYAMA, A. et al. Characterization and augmentation of CD4+ cytotoxic T cell lines against melanoma. **Cancer Immunol. Immunother.**, v.39:172-178, 1994.

NAGATA, S.; GOLSTEIN, P. The Fas death factor. **Science**, v.267, n.5203, p.1449-1456, 1995.

NAGATA, S. Apoptosis by death factor. **Cell**, v.88, n.3, p.355-365, 1997.

NCI – National Cancer Institute (USA). Melanoma. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma/healthprofessiona> | Acesso em: 20 nov. 2006.

NESTLE, M., and CAROL, H. Melanoma. In **Dermatology**. J. Bologna, J. Jorizzo, and R. Rapini, editors. Mosby. New York, New York, USA. 1789-1815, 2003.

O'GARRA, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. **Immunity**, v.8, n.3, p.275-283, 1998.

PACIFICO, M.D.; GROVER, R.; RICHMAN, P.; DALEY, F.; WILSON, G.D. Validation of tissue microarray for the immunohistochemical profiling of melanoma. **Mel. Res.**, v.14, n.1:39-42, 2004.

PEREZ, J.; GARCIA, P.M.; BAUTISTA, M.J. et al. Immunohistochemical characterization of tumor cells and inflammatory infiltrate associated with cutaneous melanocytic tumors of Duroc and Iberian swine. **Vet. Pathol.**, v.39:445-451, 2002

PIERARD-FRANCHIMONT, C.; LETAWE, C.; NIKKELS, A.F.; PIERARD, G.E. Patterns of the immunohistochemical expression of melanoma-associated antigens and density of CD45R0+ activated T lymphocytes and L1-protein

positive macrophages in primary cutaneous melanoma. **Int. J. Mol. Med.**, v.2, n.6, p.721-724, 1998.

PIRAS, F.; COLOMBARI, R.; MINERBA, L.; MURTAS, D.; FLORIS, C.; MAXIA, C.; CORBU, A.; PERRA, T.; SIRIGU, P. The predictive value of CD8, CD4, CD68 and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. **Cancer**, v.104, n.6:1246-1254, 2005.

POLLOCK, P.M.; HARPER, U.L.; HANSEN, K.S. et al High frequency of BRAF mutations in nevi. **Nat. Genet.**, v.33:19-20, 2003.

PRASAD, M.L.; JUNGBLUTH, A.A.; PATEL, S.G. et al. Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. **Head Neck**, v.26:1053-1057, 2004.

PRESS, O.W.; LEONARD, J.P.; COIFFIER, B. et al. Immunotherapy of Non-Hodgkin's lymphomas. **Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)**, v.2001, p.221-240, 2001.

RAMMENSEE, H.G.; FALK, K.; ROTZSCHKE, O. MHC molecules as peptide receptor. **Curr. Opin. Immunol.**, v.5, n.1, p.35-44, 1993.

RATHMELL, J.C.; THOMPSON, C.B. The central effectors of cell death in the immune system. **Annu. Rev. Immunol.**, v.17, p.781-828, 1999.

RATHMEL, J.C.; THOMPSON, C.B. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. **Cell**, v.109 [Suppl], p.S97-S107, 2002.

RENKVIST, N.; CASTELLI, C.; ROBBINS, P.F. et al. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. **Cancer Immunol. Immunother.**, v.50, n.1, p.3-15, 2001.

RICANIADIS, N.; KATAKI, A.; AGNANTIS, N. et al. Long-term prognostic significance of HSP-70, c-myc and HLA-DR expression in patients with malignant melanoma. **Eur. J. Surg. Oncol.**, v.1, n.27:88-93, 2001.

ROBBINS, P.F.; WANG, R.F. Tumor antigens recognized by cytotoxic lymphocytes. In: Sitkovsky MV, Henkart PA eds. **Cytotoxic cells: basic mechanisms and medical applications**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.363, 2000.

ROMAGNANI, S. The Th1/Th2 paradigm. **Immunol. Today**, v.18, n.6, p.263-266, 1997.

ROSENBERG, S.A.; YANNELLI, J.R.; YANG, J.C. et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. **J. Natl. Cancer. Inst.**, v.86:1159-1166, 1994.

ROSENBERG, S.A. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. **Immunity**, v.10, n.3, p.281-287, 1999.

ROSENBERG, S.A.; DUDLEY, M.E. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101(suppl2):14639-14645, 2004.

ROUVIER, E.; LUCIANI, M.F.; GOLSTEIN, P. Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. **J. Exp. Med.**, v.177, n.1, 195-200, 1993.

RUSCIANO, D. Differentiation and metastasis in melanoma. **Crit. Rev. Oncog.**, v.11:147-163, 2000.

RUSSELL, J.H.; LEY, T.J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Annu. Rev. Immunol.**, v.20, p.323-370, 2002.

SCHUCHTER, L.; SCHULTZ, D.J.; SYNNESTVEDT, M. et al. A prognostic model for predicting 10-year survival in patients with primary melanoma. The pigmented Lesion Group. **Ann. Intern. Med.**, v.125:369-375, 1996.

SCHWARTZ, R.H.; MUELLER, D.L. Immunological tolerance. In: Paul WE, ed., **Fundamental Immunology**, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Publishers, p. 363, 2000.

SCOLYER, R.A.; THOMPSON, J.F.; STRECH, J.R.; SHARMA, R.; MCCARTHY, S.W. Pathology of melanocytic lesions: new, controversial, and clinically important issues. **J Surg. Oncol.**, v.86, p.200-211, 2004.

SEDER, R.A.; PAUL, W.E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v.12, p.635-673, 1994.

SEDER, R.A.; MOSMANN, T.M. Differentiation of effector phenotypes of CD4+ and CD8+ T cells. In: Paul WE, ed. **Fundamental Immunology**, 4th ed., Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p.879, 1999.

SHI, L.; KRAUT, R.P.; AEBERSOLD, R. et al. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. **J. Exp. Med.**, v.175, n.2, p.553-566, 1992.

SHIH, I.M.; NESBIT, M.; HERLYN, M.; KURMAN, R.J. A new Mel-CAM (CD146)-specific monoclonal antibody, MN-4, on paraffin-embeded tissue. **Mod. Pathol.**, v.11, n.11:1098-1106, 1998.

SHIH, I.M. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. **J. Pathol.**, v.189, n.1:4-11, 1999.

SHIVERS, S.C.; WANG, X.; LI, W. et al. Molecular staging of malignant melanoma: correlation with clinical outcome. **JAMA**, v.280:1410-1415, 1998.

SLINGLUFF, C.L.Jr.; VOLLMER, R.T.; REINTGEN, D.S., et al. Lethal "thin" malignant melanoma. Identifying patients at risk. **Ann Surg.**, v.208:150-161, 1988.

SLINGLUFF, C.L.; REINTGEN, D. Malignant melanoma and the prognostic implications of pregnancy, oral contraceptives, and exogenous hormones. **Semin. Surg. Oncol.**, v.9:228-231, 1993.

SOONG, S.J.; SHAW, H.M.; BALCH, C.M. et al. Predicting survival and recurrence in localized melanoma: a multivariate approach. **World J. Surg.**, v.16:191-195, 1992.

SPATZ, A.; SHAW, H.M.; CROTTY, K.A. et al. Analysis of histopathological factors associated with prolonged survival of 10 years or more for patients with thick melanomas (>5mm). **Histopathology**, v.33:406-413, 1998.

SPITS, H.; LANIER, L.L.; PHILLIPS, J.H. Development of human T and natural killer cells. **Blood**, v.85, n.10, p.2654-2670, 1995.

STRAUME, O.; SALVESEN, H.B.; AKSLEN, L.A. Angiogenesis is prognostically important in vertical growth phase melanomas. **Int. J. Oncol.**, v.15:595-599, 1999.

STRAUSBERG, R.L.; SIMPSON, A.J.; WOOSTER, R. Sequence-based cancer genomic: progress, lessons and opportunities. **Nat. Rev. Genet.**, v.4, n.6, p.409-418, 2003.

SUNG, J.; LI, W.; SHIVERS, S. et al. Molecular analysis in evaluating the sentinel node in malignant melanoma. **Ann. Surg. Oncol.**, v.8:29S-30S, 2001.

TAKAHASHI, T.; CHAPMAN, P.B.; YANG, S.Y. et al. Reactivity of autologous CD4+ T lymphocytes against human melanoma. Evidence for a shared melanoma antigen presented by HLA-DR15. **J. Immunol.**, v.154:772-779, 1995.

TANAKA, Y.; ADAMS, D.H.; SHAW, S. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. **Immunol. Today**, v.14, n.3, p.111-115, 1993.

TEFANY, F.J.; BARNETSON, R.S.; HALLIDAY, G.M. et al. Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in primary regressing and non-regressing malignant melanoma. **J. Invest. Dermatol.**, v.97:197-202, 1991.

THOMAS, W.D.; HERSEY, P. CD4 T cells kill melanoma cells by mechanisms that are independent of Fas (CD95). **Int. J. Cancer**, v.75:384-390, 1998.

THOR STRATEN, P.; GULDBERG, P.; MOERCH, U.; BECKER, J.C. Anti-melanocyte T cell responses – methodology versus biology. **J. Invest. Dermatol.**, v.114:738-739, 2000.

TOES, R.E.; OSSENDORP, F.; OFFRINGA, R. et al. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. **J. Exp. Med.**, v.189, n.5, p.753-756, 1999.

TOPALIAN, S.L.; SOLOMON, D.; ROSENBERG, S.A. Tumor-specific cytotoxicity by lymphocytes infiltrating human melanomas. **J. Immunol.**, v.142, n.10:3714-3725.

TUCKER, M.A. et al. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. **JAMA**, v.277:1439-1444, 1997.

TUTHILL, R.J.; UNGER, J.M.; LIU, P.Y.; FLAHERTY, L.E.; SONDAK, V.K. Risk assessment in localized primary melanoma: a Southwest Oncology Group study evaluating nine factors and a test of the Clark logistic regression prediction model. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.4:504-511, 2002.

URTEAGA, O., PACK, G.T. On the antiquity of melanoma. **Cancer**, Philadelphia, v.19, n.5, p.826-27, 1966.

VAN PARIJS, L.; ABBAS, A.K. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. **Science**, v.280, p.243-248, 1998.

VERONESI, U. Il melanoma: Diagnosi e trattamento specialistico. **Masson**, Milano, Prima Edizione, p.15, 2000.

VICARI, A.P.; CAUX, C. Chemokines in cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.13:143-154, 2002.

VOSSAERT, K.A.; SILVERMAN, M.K.; KOPF, A.W. et al. Influence of gender on survival in patients with stage I malignant melanoma. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.26(3pt2):429-440, 1992.

WALSH, C.M.; MATLOUBIAN, M.; LIU, C.C. et al. Immune function in mice lacking the perforin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, n.23, p.10854-10858, 1994.

WALDMANN, T.A.; LEVY, R.; COLLIER, B.S. Emerging therapies: spectrum of applications of monoclonal antibody therapy. **Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)**, v.2000, p.394-408, 2000.

WEINLICH, G.; BITTERLICH, V.; FRITSCH, P.O.; ZELGER, B. Metallothionein overexpression as a prognostic factor for progression and survival in melanoma. A prospective study on 520 patients. **British J. Dermatol.**, v.149,n.3:535-541, 2003.

WIZNEROWICZ, M.; FONG, A.Z.; MACKIEWICZ, A. et al. Double-copy bicistronic retroviral vector platform for gene therapy and tissue engineering: application to melanoma vaccine development. **Gene Ther.**, v.1061-1068, 1997.

YAGITA, H.; NAKATA, M.; KAWASAKI, A. et al. Role of perforin in lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Adv. Immunol.**, v.51, p.215-242, 1992.

YAZDI, A.S.; MORSTEDT, K.; PUCHTA, U.; GHORESCHI, K.; FLAIG, M.J.; ROCKEN, M.; SANDER, C.A. Heterogeneity of T-cell clones infiltrating malignant melanomas. **J. Invest. Dermatol.**, v.126:393-398, 2006.

ZETTERSTEN, E.; SHAIKH, L.; RAMIREZ, R. et al. Prognostic factors in primary cutaneous melanoma. **Surg. Clin. North. Am.**, v.83:61-75, 2003.

ZOLA, H. et al. Protein reviews on the Web. World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/> Acesso em: 20 jan. 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)