

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**FACULDADE DE MEDICINA**



**MELANOMA MALIGNO – VARIEDADE DESMOPLÁSICA**  
**CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS**  
**COM VALOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO**

**LUÍS MIGUEL DOS SANTOS REIS SOARES DE ALMEIDA**

Doutoramento em Medicina  
Especialidade de Dermatologia e Venereologia

Lisboa  
2009

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

FACULDADE DE MEDICINA



**MELANOMA MALIGNO – VARIEDADE DESMOPLÁSICA**  
**CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS**  
**COM VALOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO**

**LUÍS MIGUEL DOS SANTOS REIS SOARES DE ALMEIDA**

Orientador: Professor Doutor M. Marques Gomes

Co-orientador: Professor Doutor Luís Requena Caballero

Doutoramento em Medicina  
Especialidade de Dermatologia e Venereologia

Lisboa  
2009

As opiniões expressas são da exclusiva responsabilidade do seu autor

**A impressão desta dissertação foi aprovada pela  
Comissão Coordenadora do Conselho Científico  
da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião  
de 22 de Setembro de 2009**



*À Ana*  
*À minha Mãe*  
*Aos meus Filhos*  
*Às minhas Irmãs*



## Índice

AGRADECIMENTOS	ix
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xvii
RESUMEN	xxi
PALAVRAS-CHAVE / KEYWORDS	xxv
ABREVIATURAS	xxvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MELANÓCITO	
2.1. Melanócito na pele normal	3
2.2. Melanócito nos nevos melanocíticos	5
2.3. Transformação maligna do melanócito	6
3. MELANOMA MALIGNO	
3.1. Conceito e definições	11
3.2. Critérios de diagnóstico	
3.2.1. Clínicos	12
3.2.2. Histológicos	14
3.3. Tipos	15
3.4. Incidência, prevalência e mortalidade	16
3.5. Caracterização histológica	18
3.6. Caracterização imuno-histoquímica	
3.6.1. Marcadores de diferenciação melanocítica	21
3.6.2. Marcadores de progressão e sinalização tumoral	26
3.6.3. Marcadores de células do estroma	34
3.6.4. Outros marcadores	37
3.6.5. Painéis de marcadores	38
3.7. Factores de prognóstico	39

4. MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO	
4.1. Conceito	45
4.2. Critérios de diagnóstico	
4.2.1. Clínicos	47
4.2.2. Histológicos	48
4.2.3. Imuno-histoquímicos	49
4.3. Diagnóstico diferencial	54
4.4. Prognóstico	57
5. ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E ESTATÍSTICO DO MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO	
5.1. Objectivos e proposição de estudo	61
5.2. Material e métodos	62
5.3. Resultados	
5.3.1. Clínicos e de correlação clínico-patológica	69
5.3.2. Histopatológicos	75
5.3.3. Imuno-histoquímicos	83
5.3.4. Estatísticos	95
6. DISCUSSÃO	99
7. CONCLUSÕES	121
8. BIBLIOGRAFIA	125
9. ANEXOS	
9.1. Figuras	151
9.2. Quadros	154
9.3. Gráficos	155
9.4. Tabela da série estudada	157

## Agradecimentos

- Ao Professor Doutor Marques Gomes, Director da Clínica Dermatológica Universitária de Lisboa e regente da cadeira de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Lisboa, pelo convite para ser seu Assistente, pelo desafio para avançar para a obtenção do grau de Doutor e por ter aceite ser meu orientador de dissertação.
- Ao Professor Doutor Luís Requena, da Universidade Autónoma de Madrid, responsável principal pela minha formação em Dermatopatologia e pelo seu entusiasmo na co-orientação desta dissertação.
- Ao Professor Doutor Heinz Kutzner, director do Laboratório *Dermatopathologie Friedrichshafen, Bodensee*, na Alemanha, pelo contínuo apoio e estímulo diário aquando da realização dos estágios aí efectuados, assim como pela disponibilidade total do seu Laboratório aquando da realização do estudo imuno-histoquímico da tese e da execução por PCR, da pesquisa da mutação do gene *BRAF*.
- Ao Doutor Arno Rütten, dermatopatologista do mesmo Laboratório em Friedrichshafen, pela disponibilidade com que me facultou a utilização do material que integra este trabalho.
- Ao Professor Doutor Claus Garbe, da Universidade de Tübingen, a cedência da informação clínica contida no registo oncológico alemão, pelo qual é responsável, referente à evolução clínica dos doentes.
- Ao Professor Doutor Dinis Pestana, Professor Catedrático de Estatística da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa pela ajuda no tratamento estatístico dos dados do nosso trabalho e pelo convite para integrar o CEAUL (Centro de Estatística Aplicada da Universidade de Lisboa) pelo qual é responsável.

- Ao Professor Doutor Guerra Rodrigo, Professor Catedrático de Dermatologia da FML, que foi o primeiro a convidar-me para ser seu Assistente e me nomeou responsável pelo Laboratório de Histopatologia Cutânea da Clínica Dermatológica Universitária de Lisboa.
  
- Ao Professor Doutor Afonso Fernandes, director do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Santa Maria, a revisão crítica de algumas partes do texto.
  
- Ao Doutor Mayer da Silva, Dermatologista da Clínica Dermatológica Universitária de Lisboa, a revisão crítica de algumas partes do texto.
  
- À Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia, pela concessão de várias Bolsas Cabral de Ascensão que me permitiram efectuar frequentes deslocações a Madrid e Friedrichshafen para a realização deste trabalho.

*“...Only three diagnoses are available when a histopathologist assesses a proliferation of melanocytes in the skin: (1) nevus, (2) melanoma, and (3) melanoma in association with a nevus. If a histopathologist cannot make one of those three diagnoses, then the honest response, phrased in Old English, should be “Ic ne wat,” i.e., “I don’t know.” No attempt should be made to maneuver behind hedges, euphemisms, and non-diagnoses like “active junctional nevus,” “atypical melanocytic hiperplasia,” “pagetoid melanocytic proliferation,” “mild, moderate, and severe dysplasia,” “borderline melanoma,” “minimal deviation melanoma.” These phrases are evasions that do not communicate to a clinician, directly and forthrightly, whether the lesion under consideration is a nevus, a melanoma, or a melanoma in association with a nevus. Furthermore, they permit a histopathologist to sustain the delusion that a diagnosis actually is being made when, in truth, only an inadequate description, badly phrased, is being rendered...”*

A.B. Ackerman, L. Cerroni e H. Kerl<sup>1</sup> in *Pitfalls in histopathologic diagnosis of malignant melanoma*



## Resumo

O presente trabalho divide-se em duas grandes áreas: na primeira revêem-se aspectos biológicos e patológicos do melanócito e nevo pigmentado (capítulo 2), do melanoma maligno (MM) cutâneo (capítulo 3) e do melanoma maligno desmoplásico (MMD) (capítulo 4); na segunda relata-se a contribuição pessoal para o conhecimento do MMD – descrição do estudo – material, métodos e resultados (capítulo 5), discussão (capítulo 6) e conclusões (capítulo 7).

O primeiro capítulo é uma breve introdução sobre a importância do diagnóstico correcto das lesões melanocíticas.

O segundo capítulo é dedicado ao melanócito: origem embriológica, localização e morfologia. Discute-se a patogénese dos nevos melanocíticos e a transformação maligna de melanócitos incluindo algumas das aberrações moleculares que podem ocorrer.

No terceiro capítulo dedicado ao MM cutâneo em geral expõem-se os critérios clínicos e histológicos que permitem o diagnóstico e classificação nos seus 4 tipos principais: MM de crescimento superficial, MM sobre lântigo maligno, MM nodular e MM acrolentiginoso. Revê-se a incidência, prevalência e mortalidade do MM em geral. Procede-se à caracterização de alguns marcadores usados no estudo de tumores agrupados em 3 grandes grupos: de diferenciação melanocítica, de progressão e sinalização tumoral e de marcação de células do estroma. Para cada marcador é registado o compartimento celular de marcação (nuclear, citoplásmica e/ou de membrana), quais as células que o podem expressar, assim como os tumores que podem marcar. Nos marcadores de progressão e sinalização tumoral é explicado o papel desempenhado por cada proteína e a fase celular em que intervém. Prossegue-se com a

enumeração dos factores clínicos, histológicos e imuno-histoquímicos com valor prognóstico, explicação sumária da classificação TNM e dos grupos de estadiamento do MM cutâneo.

No quarto capítulo efectua-se uma revisão bibliográfica de MMD. A primeira descrição remonta a 1971 por Conley e col. e o conceito de MM neurotrópico de Reed e Leonard foi publicado em 1979. São revistos os seus critérios de diagnóstico: clínicos, histológicos e imuno-histoquímicos. Aborda-se a variação dos conceitos de prognóstico do MMD em comparação com o MM cutâneo em geral, ao longo do tempo, tendo o MMD sido associado sucessivamente a um pior prognóstico nos anos 80, a um melhor prognóstico nos anos 90 e actualmente a um prognóstico igual aos outros tipos de MM de acordo com a sua espessura. Busam e col. em 2004 e Hawkins e col. em 2005 chamam a atenção para a heterogeneidade fenotípica do MMD realçando a necessidade da separação em dois grandes grupos de acordo com a área que o componente desmoplásico ocupa no total do tumor: superior a 80 ou 90% denominado MMD “puro” ou quando apenas existem focos de desmoplasia num MM “convencional” deverão ser chamados de “misto” ou “combinado”. Destaca-se a maior tendência do MMD para a recidiva local, principalmente quando a margem livre de tumor da excisão cirúrgica é inferior a 1 cm que pode ser explicada pela sua localização frequente na face. Discute-se a utilidade da realização de biópsia de gânglio sentinela, por rotina, como procedimento diagnóstico e de estadiamento prognóstico quando é sabido que a metastização ganglionar é muito rara neste tipo de MM. A metastização sistémica ocorre com maior frequência para o pulmão.

No capítulo 5 relata-se o estudo de 113 casos de doentes com MMD provenientes do arquivo do Laboratório *Dermatopathologie Friedrichshafen, Bodensee* (Professor Doutor Heinz Kutzner e Doutor Arno Rütten), na Alemanha, tendo tido como objectivos a análise das características clínicas e histopatológicas da totalidade dos casos, da utilidade das técnicas imuno-histoquímicas no seu diagnóstico e registo da pesquisa da mutação V600E no gene BRAF efectuada por PCR, complementadas por uma análise estatística exploratória dos resultados.

Por compilação da informação clínica dos doentes, contida nas requisições que acompanhavam as amostras de pele procedeu-se ao registo de 4 variáveis clínicas: sexo, idade, localização e hipótese diagnóstica. Com recurso ao contacto do médico assistente complementado com os dados recolhidos no registo oncológico alemão (Professor Doutor Claus Garbe) foi possível saber a evolução clínica de 55 dos doentes.

## RESUMO

Procedeu-se à observação das lâminas dos 113 casos coradas por H&E com registo e análise de 20 variáveis histológicas: grau de desmoplasia, componente intraepitelial, envolvimento folicular, elastose solar, ulceração, nível de Breslow (espessura em mm), grau de Clark, invasão neural, invasão vascular, padrão celular (forma dos melanócitos e dos seus núcleos), índice mitótico, pigmento melânico, agregados linfóides, infiltrado inflamatório, regressão (definida como fibrose da derme papilar, ectasia capilar, infiltrado inflamatório linfocitário e atrofia da epiderme), variação de espessura da epiderme, faixa de Grenz, nevo associado, mucina e metaplasia cartilaginosa ou óssea.

Realizou-se estudo-piloto de imunomarcção em 15 casos com 25 anticorpos de diferenciação melanocítica (S-100, HMB-45, Melan-A, Tirosinase, MITF, CD117 e P75), de estudo da progressão e sinalização tumoral (Ki-67, MPM-2, Ciclina D1, CDK2, CDK4, RB, P16, P19, P21, P27 e PTEN) e de estudo de células do estroma (N-caderina, Fascina, CD13, Actina do músculo liso 1A4, CD34, GLUT-1 e Claudina).

A pesquisa da mutação BRAF por PCR foi negativa para os 15 casos testados.

Procedeu-se à descrição dos métodos estatísticos utilizados.

No capítulo 6 discutem-se os resultados obtidos. Analisaram-se as possíveis causas de erro diagnóstico tanto do ponto de vista clínico como histológico, com especial ênfase nos aspectos de diagnóstico diferencial com outras neoplasias de células fusiformes e discutiu-se a origem e aspectos de benignidade/malignidade do componente desmoplásico.

No capítulo 7 registámos as conclusões do estudo sendo de destacar que o MMD ocorre geralmente na cabeça e pescoço (75%) de doentes com idade superior a 60 anos (88%), sem predilecção por sexo (48♂ / 52♀). Só em 1/3 dos casos a hipótese clínica de MM foi colocada e em outro 1/3 o diagnóstico clínico foi de lesão cutânea benigna. Dos 55 doentes cuja evolução clínica foi conhecida observou-se recidiva local em 4%, invasão ganglionar em 2% e metastização à distância em 9%, pertencendo 4 dos 5 doentes ao grupo dos MMD “mistos”.

Na histologia, a maioria dos tumores era mal delimitado, envolvia toda a espessura da derme (96% dos casos eram nível de Clark IV/V) e 57% tinham uma espessura superior a 4mm no momento do diagnóstico. A dificuldade no diagnóstico pode ser explicada em parte pelo baixo índice mitótico das células tumorais (72% dos casos com um número de mitoses inferior a

1 por 10 campos de grande ampliação), pela ausência de pigmento melânico em 71% dos casos e pela ausência de componente melanocítico intraepidérmico atípico em 19% dos casos. Presença de agregados linfóides em redor ou dentro do tumor foi registado em 37% dos casos nomeadamente nos MMD “puros” (53%). Observou-se uma correlação directa entre a presença de neurotropismo (35% dos MMD) e a maior espessura tumoral ( $p < 0,05$ ).

O estudo imuno-histoquímico demonstrou o interesse da utilização de painel de marcadores de diferenciação melanocítica pois além da positividade para proteína S100 usada por nós como critério diagnóstico, os anticorpos HMB-45, Melan-A, MITF e tirosinase só foram focalmente positivos no componente melanocítico superficial, quando estes tinham uma morfologia epitelióide. De grande utilidade não só no diagnóstico como na avaliação das margens livres de tumor foi o marcador P75 que é fortemente positivo na quase totalidade dos casos. O baixo índice mitótico celular foi confirmado pelo marcador MPM-2. Dos marcadores de proliferação tumoral testados confirmou-se uma elevação de Ciclina D1 e de CDK2 na maioria dos casos, apesar de CDK4 ser quase sempre negativa. Os inibidores de CDK foram negativos em cerca de metade dos P16 testados e na totalidade dos P19. Não foi possível demonstrar a presença da proteína oncosupressora PTEN em 8 dos 15 casos testados. O gene do *Retinoblastoma* foi detectado em 11 dos 15 casos estudados. Os marcadores de células do estroma habitualmente associados a um pior prognóstico como a N-caderina e a Fascina foram positivos em 11/15 e em 4/14 casos testados, respectivamente.

Este conjunto de dados levam-nos a sugerir que o tumor resulte essencialmente da inibição da apoptose das células tumorais, representada pela ausência de PTEN e de P19 e não só pela via proliferativa do MAPK, expresso pelo escasso número de mitoses. Especulamos assim, ter o dano actínico crónico papel importante na génese deste tumor.

O tempo de seguimento dos doentes investigados não foi suficiente para obter conclusões sobre o valor prognóstico dos marcadores.

No caso dos MMD ainda não existem sínteses meta-analíticas, uma vez que os estudos publicados não contêm suficiente informação quantitativa para se fazerem estudos meta-analíticos credíveis, mesmo recorrendo à meta-análise cumulativa.

## **Abstract**

The present work is divided into two main areas: the first one, in which we review some pertinent aspects of the biology and pathology of the melanocyte and pigmented melanocytic nevus (chapter 2), of the cutaneous malignant melanoma (MM) (chapter 3) and of the desmoplastic malignant melanoma (DMM) (chapter 4); the second one, in which we describe the personal contribution for the knowledge of DMM – description of the study – material, methods and results (chapter 5), discussion (chapter 6) and conclusions (chapter 7).

The first chapter is a brief introduction about the pitfalls in the diagnosis of melanocytic lesions.

The second chapter is devoted to the melanocyte: embryology, location and morphology. The pathogenesis of melanocytic nevi and the malignant transformation of melanocytes are discussed, including some of the molecular aberrations that can occur.

The third chapter concerns the clinical and histological criteria of MM that allow the diagnosis and classification in one of its 4 main types: superficial spreading, lentigo maligna, nodular and acral. MM are described, followed by a review on the incidence, prevalence and mortality of MM in general. This chapter also includes an overview on some melanocytic differentiation, progression and signalling tumor markers, as well as of stromal cells, and its immunohistochemical labelling and meaning. It continues with the indication of clinical factors, histological and immunohistochemical data having prognostic value, and a brief explanation of the TNM classification and the staging group for cutaneous MM.

In the fourth chapter a literature review of DMM is carried out. The first description of DMM dates back to 1971 by Conley et al. and the concept of neurotropic MM by Reed and Leonard was published in 1979. It reviews the criteria for DMM diagnosis made by clinical, histological and immunohistochemical studies. It also discusses the change of the terms of prognosis of DMM compared with cutaneous MM in general. DMM has been in turn associated with a worse prognosis in the 80's, a better prognosis in the 90's, and currently an equal

prognosis to other types of MM according to their thickness. In 2004, Busam et al. and in 2005, Hawkins et al. called the attention to the phenotypic heterogeneity of the DMM, highlighting the need for its separation into two major groups according to the area that the desmoplastic component occupies in the total tumor: when it is more than 80 or 90% of the DMM area it must be called “pure” DMM and when there are only pockets of desmoplasia in an otherwise conventional MM type it should be called “combined” or “mixed”. It highlights the greater tendency of the DMM for local recurrence, especially when the free margin of tumor excision is less than 1 cm, which can be explained by their common location on the face. It discusses the usefulness of performing sentinel lymph node biopsy routinely as a diagnostic procedure for staging and prognosis when it is known that lymph nodes metastasis is very rare in this type of MM. Systemic metastasis occurs more frequently in the lungs.

In Chapter 5 we proceed to the study of 113 cases of patients diagnosed with DMM in the *Dermatopathologie Friedrichshafen Laboratory, Bodensee*, Germany (Heinz Kutzner, MD PhD and Arno Rütten, MD) with the objective of clinical and histopathological analysis of all cases, and of the use of immunohistochemical techniques for their diagnosis. We also evaluated the V600E mutation in *BRAF* gene by PCR, and performed an exploratory statistical analysis of the results.

Patient clinical data contained in the forms received by the laboratory with the skin samples were used to record 4 clinical variables: sex, age, location and clinical diagnosis. After contacting the patient’s doctor, this information was supplemented with data collected in the German Cancer Register (Claus Garbe, MD PhD), which made it possible to figure out the clinical outcome of 55 patients.

In the study, all the slides stained with H & E were examined and analyzed using 20 histological variables: degree of desmoplasia, intraepithelial melanocytic component, follicular involvement, solar elastosis, ulceration, Breslow level (thickness size in mm), Clark level, neural and vascular invasion, cell pattern (morphology of the melanocytes and their nuclei), mitotic index, melanin pigment, lymphoid aggregates, inflammatory infiltrate, regression (defined as fibrosis of the papillary dermis, capillary ectasia, inflammatory infiltrate of lymphocytes and atrophy of the epidermis), variation in thickness of the epidermis, Grenz zone, associated melanocytic nevus, stromal mucin and cartilage or bone metaplasia.

A selected immunohistochemical study was carried out using 25 antibodies to melanocytic differentiation (S-100, HMB-45, Melan-A, Tyrosinase, MITF, CD117 and P75), to tumor progression and signaling markers (Ki-67, MPM-2, Cyclin D1, CDK2, CDK4, RB, P16,

## ABSTRACT

P19, P21, P27 and PTEN) and also to stromal cell markers on the tumoral cells (N-cadherin, Fascin, CD13, 1A4 - smooth muscle actin -, CD34, GLUT-1 and Claudin) was done.

*BRAF* mutation was negative in all the 15 cases evaluated by PCR.

Statistical methods are described.

In Chapter 6 we compared the results obtained in our study with the ones from the literature. We analyzed the possible causes of diagnostic errors, both clinical and histological, with special emphasis to differential diagnosis with other spindle cell neoplasms and we discuss the origin and aspects of benign or malignant desmoplastic component.

In Chapter 7 we recorded the findings of the study, being important to highlight that DMM is usually located on the head and neck (75%) of patients aged over 60 years (88%), with no gender predilection (48 ♂ / 52 ♀). Only in 1 / 3 of the cases the clinical suspicion of MM was stated and in another 1 / 3, the clinical diagnosis stated was of a benign skin lesion. Of the 55 patients whose clinical follow-up was known there was local recurrence 4% of the times, lymph node invasion in 2% of the cases and systemic metastasis in 9% of the patients (4 of these 5 patients belonged to the group of "combined" DMM).

Most tumors were poorly defined, involved the entire thickness of the dermis (96% were Clark level IV / V) and 57% had a thickness exceeding 4 mm at the time of diagnosis. Low mitotic index of tumor cells (72% of the cases had less than 1 mitosis per 10 HPF), the lack of melanin pigment in 71% of cases and the absence of atypical intraepidermal melanocytic component in 19% of cases may difficult the immediate identification of the tumor. Presence of lymphoid aggregates around or inside the tumor was recorded in 37% of cases, particularly in the "pure" DMM (53%). There was a direct correlation between the presence of neurotropism (35% of DMM) and greater tumor thickness ( $p < 0.05$ ).

The immunohistochemical study demonstrated the advantage of using a melanocytic differentiation panel of markers. Besides using the positivity for S100 protein as diagnostic criteria, we found that HMB-45, Melan-A, MITF and Tyrosinase were only focally positive on the superficial melanocytic component, cells with epithelioid morphology. Very useful, not only for diagnosis but also to evaluate the tumor-free margins, was the strongly positive P75 marker in almost all cases. Low mitotic index was confirmed by the MPM-2 marker. Cyclin D1 and CDK2 (proliferative markers) were positive in most cases, while CDK4 was almost always negative. CDK inhibitors were negative in about half of the P16 and in all of the P19 tested cases. We were unable to demonstrate the presence of PTEN oncosuppressor protein in 8 of 15 tested cases. The *retinoblastoma* gene was detected in 11 of the 15 cases studied. N-cadherin and

Fascina, stroma cells markers, usually associated with a worse prognosis in MM, were positive in 11/15 and 4 / 14 of the tested cases, respectively.

The overall analysis of these data led us to the suggestion that this tumor is a result mainly from apoptosis and not only by MAPK pathway. Chronic actinic damage may play a key role in the tumoral genesis.

The patients' follow-up was short thus limiting any investigation about the prognostic meaning of the markers.

Meta-analysis of published DMM cases is not yet possible due to the incompleteness of the published information, even using cumulative meta-analysis.

## Resumen

El trabajo presentado se divide en dos grandes áreas: en la primera se revisan aspectos biológicos y patológicos del melanócito y del nevus pigmentado (capítulo 2), del melanoma maligno (MM) cutáneo (capítulo 3) y del melanoma maligno desmoplásico (MMD) (capítulo 4); en la segunda se relata la contribución personal para el conocimiento del MMD – descripción del estudio – material, métodos y resultados (capítulo 5), discusión (capítulo 6) y conclusiones (capítulo 7).

El primer capítulo es una pequeña introducción sobre la importancia del diagnóstico correcto de las lesiones melanocíticas.

El segundo capítulo está dedicado al melanócito: origen embriológico, localización y morfología. Se discute la patogénesis de los nevos melanocíticos y la transformación maligna de los melanocitos incluyendo algunas de las anomalías moleculares que pueden ocurrir.

El tercer capítulo está dedicado al MM cutáneo en general, exponiendo los criterios clínicos e histológicos que permiten el diagnóstico y la clasificación en sus 4 tipos principales: MM de crecimiento superficial, MM sobre Léntigo maligno, MM nodular y MM acrolentiginoso. Se revisa la incidencia, prevalencia y mortalidad del MM en general. Se procede a la caracterización de algunos marcadores usados en el estudio de tumores, agrupados en 3 grandes grupos: de diferenciación melanocítica, de progresión y señalización tumoral y de marcación de células del estroma. Para cada marcador se registró la localización celular del marcador estudiado (nuclear, citoplásmica y/o de membrana), cuales eran las células que podían expresarlo, así como los tumores que se pueden marcar. Los marcadores de progresión y señalización tumoral se analizaron explicando el papel desempeñado por cada proteína y la fase proliferativa celular en la que intervienen. A continuación se enumeran los factores clínicos, histológicos e inuno-histoquímicos con valor pronóstico, explicando de manera resumida la clasificación TNM y los grupos de estadiaje del MM cutáneo.

En el cuarto capítulo se efectúa una revisión bibliográfica del MMD. La descripción original fue publicada en 1971 por Conley et al. y el concepto de MM neurotrópico de Reed y Leonard fue publicado en 1979. Se revisan sus criterios de diagnóstico: clínicos, histológicos e immuno-histoquímicos. Se aborda la variación de los conceptos de pronóstico del MMD en comparación con el MM cutáneo en general, a lo largo del tiempo, ya que el MMD ha sido asociado sucesivamente a un peor pronóstico en los años 80, a un mejor pronóstico en los años 90 y actualmente a un pronóstico igual al de otros tipos de MM de acuerdo con su espesor. Busam et al. en 2004 y Hawkins et al. en 2005 llaman la atención sobre la heterogeneidad fenotípica del MMD, recalcando la necesidad de separación en dos grandes grupos de acuerdo con el área que el componente desmoplásico ocupa en la totalidad del tumor: superior a 80 o 90%, denominando entonces al tumor MMD “puro”, o cuando apenas existen focos de desmoplasia en un MM “convencional”, que entonces deberá ser denominado “mixto” o “combinado”. Destaca la mayor tendencia del MMD a la recidiva local, principalmente cuando el margen libre de tumor en la extirpación quirúrgica es inferior a 1 cm, lo que puede explicarse por su localización frecuente en la cara. Se discute la utilidad de la realización de rutina de la biopsia del ganglio centinela, como procedimiento diagnóstico y de estadiaje pronóstico, teniendo en cuenta que la metastatización ganglionar es muy rara en este tipo de MM. Las metástasis sistémicas más frecuentes son al pulmón.

En el capítulo 5 se procede al estudio de 113 casos de pacientes con MMD diagnosticados en el Laboratorio *Dermatopathologie Friedrichshafen, Bodensee* (Profesor Doctor Heinz Kutzner e Doctor Arno Rütten), en Alemania, teniendo como objetivos el análisis de las características clínicas y histopatológicas de la totalidad de los casos, la utilidad de las técnicas immuno-histoquímicas en su diagnóstico, la investigación de la mutación V600E en el gen *BRAF* efectuada mediante PCR y complementada por el análisis estadístico de los resultados.

Para la recopilación de la información clínica de los pacientes se utilizaron los datos que se aportaban en la hoja que acompañaban las muestras de piel enviadas para estudio histopatológico, registrándose 4 variables clínicas: sexo, edad, localización e hipótesis diagnóstica. Como recurso adicional, se contactó con el médico que asistió originalmente a cada paciente y se complementaron los datos con los obtenidos en el registro oncológico alemán (Profesor Doctor Claus Garbe), con lo que fue posible obtener la evolución clínica de 55 pacientes.

## RESUMEN

Se procedió al estudio de todas las preparaciones histopatológicas teñidas con H&E, registrándose 20 parámetros histopatológicos: grado de desmoplasia, componente intraepitelial, afectación folicular, elastosis solar, ulceración, nivel de Breslow (espesor en mms), grado de Clark, invasión neural, invasión vascular, patrón celular (morfología de los melanócitos y de sus núcleos), índice mitótico, pigmento melánico, agregados linfoides, infiltrado inflamatorio, regresión (definida por fibrosis de la dermis papilar, ectasia capilar, infiltrado inflamatorio linfocitario y atrofia de la epidermis), variación del espesor de la epidermis, banda de Grenz, nevo melanocítico asociado, mucina y presencia de metaplasia cartilaginosa u ósea.

Se realizó un estudio inmunohistoquímico con 25 anticuerpos de diferenciación melanocítica (S-100, HMB-45, Melan-A, Tirosinasa, MITF, CD117 y P75), de la progresión y señalización tumoral (Ki-67, MPM-2, Ciclina D1, CDK2, CDK4, RB, P16, P19, P21, P27 y PTEN) y del estudio de las células del estroma (N-caderina, Fascina, CD13, Actina de músculo liso 1A4, CD34, GLUT-1 y Claudina).

La investigación de la mutación del *BRAF* por PCR resultó negativa en los 15 casos estudiados.

Se procedió a la descripción de los métodos estadísticos utilizados.

En el capítulo 6 se procedió a la discusión de los resultados obtenidos y a su comparación con los de la literatura. Se analizaron las posibles causas de error en el diagnóstico, tanto desde el punto de vista clínico como histológico, con especial énfasis en los aspectos del diagnóstico diferencial con otras neoplasias de células fusiformes y se discute tanto el origen como el carácter de benignidad/malignidad del componente desmoplásico.

En el capítulo 7 se enumeran las conclusiones de este estudio, destacando que el MMD ocurre generalmente en la cabeza y en el cuello (75%) de los pacientes con edad superior a los 60 años (88%), sin predilección por ningún sexo (48♂ / 52♀). Sólo en 1/3 de los casos se planteó la hipótesis clínica de MM y en otro 1/3 el diagnóstico clínico fue de lesión cutánea benigna. De los 55 pacientes en los que se conocía la evolución clínica, se observó recidiva local en el 4%, invasión ganglionar en el 2% y metástasis a distancia en el 9%, perteneciendo 4 de los 5 pacientes al grupo de los MMD "mixtos".

En la mayoría de los casos, el tumor estaba mal delimitado, afectaba a todo el espesor de la dermis (96% de los casos tenían un nivel de Clark IV/V) y el 57% tenían un espesor superior a 4 mm en el momento del diagnóstico. La dificultad en el diagnóstico se puede explicar en parte por el bajo índice mitótico de las células tumorales (72% de los casos con un número de mitosis inferior a 1 por 10 campos de gran aumento), por la ausencia de pigmento melánico en el 71%

de los casos y por la ausencia de componente melanocítico intraepidérmico atípico en el 19% de los casos. Se observó la presencia de agregados linfoides alrededor o dentro del tumor en el 37% del total de los casos y en el 53% de los MMD “puros”. Se observó una correlación directa entre la presencia de neurotropismo (35% de los MMD) y el mayor espesor tumoral ( $p < 0,05$ ).

El estudio inmuno-histoquímico demostró la utilidad de estudiar un panel de marcadores de diferenciación melanocítica, pues además de la positividad de la proteína S100 que se utilizó como requisito diagnóstico, el HMB-45, el Melan-A, el MITF y la tirosinasa sólo fueron focalmente positivos en el componente melanocítico superficial, y cuando estos melanocitos tenían una morfología epitelioide. De gran utilidad, no sólo en el diagnóstico sino también en la evaluación de los márgenes libres de tumor, fue el marcador P75, que fue intensamente positivo en la casi totalidad de los casos. El bajo índice mitótico fue confirmado por el marcador MPM-2. De los marcadores de proliferación tumoral estudiados, se confirmó una elevación de la Ciclina D1 y de CDK2 en la mayoría de los casos, a pesar de que CDK4 fue casi siempre negativa. Los inhibidores de CDK fueron negativos en casi la mitad de los casos estudiados para P16 y en la totalidad de los casos estudiados para P19. No fue posible demostrar la presencia de la proteína oncosupresora PTEN en 8 de los 15 casos estudiados. El gen del *retinoblastoma* se detectó en 11 de los 15 casos estudiados. Los marcadores de las células del estroma habitualmente asociados a un peor pronóstico como la N-caderina y la Fascina fueron positivos en 11/15 y en 4/14 de los casos estudiados, respectivamente.

El conjunto de los datos de nuestro estudio nos permiten sugerir que el tumor es resultado principal de la inhibición de apoptosis de las células tumorales, de acuerdo con la ausencia de PTEN y de P19 y no por la vía MAPK apenas, expresado por el reducido número de mitosis. Especulamos así, que el daño actínico tiene un papel importante en la génesis del tumor.

El tiempo de seguimiento de los pacientes investigados fue corto y por eso no fue posible obtener conclusiones sobre el valor pronóstico de los marcadores.

En el caso del MMD todavía no existen estudios meta-analíticos, porque los estudios publicados no aportan suficiente información cuantitativa para hacer fiables estos estudios, incluso recurriendo a un meta-análisis acumulativo.

## **Palavras-chave**

Melanócito

Melanoma maligno

Melanoma maligno desmoplásico

Tumor melanocítico

## **Keywords**

Melanocyte

Malignant melanoma

Desmoplastic malignant melanoma

Melanocytic tumor



## Abreviaturas

- AJCC: *American Joint Commission on Cancer Staging Committee*
- AKT: *non-specific serine/threonine protein kinase*
- AML: actina do músculo liso
- AMPc: monofosfato de adenosina cíclico
- BRAF: *gene v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*
- BRAF: proteína *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*
- CD13: aminopeptidase N
- CD34: *hematopoietic progenitor cell antigen CD34 precursor*
- CDK: quinase dependente da Ciclina
- CDKi: inibidor da quinase dependente da Ciclina
- CGH: hibridização genómica comparativa
- ERK: *extracellular signal-regulated kinases*
- H&E: hematoxilina e eosina
- FCR: fase de crescimento radial
- FCV: fase de crescimento vertical
- G0: fase celular de repouso
- G1: fase celular proliferativa que antecede a fase S do ciclo celular
- G2: fase celular proliferativa que antecede a fase M do ciclo celular
- GLUT-1: *human erythrocyte glucose transporter 1*
- HMB-45: *human melanoma black-45*
- IHQ: imuno-histoquímica
- Ki-67 (MIB-1): marcador de proliferação celular
- KIT (CD117): *v-KIT Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*
- LM: léntigo maligno
- M: fase do ciclo celular correspondente à mitose
- MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

*MDM-2: Murin double minute – 2 oncogene*

*MEK: mitogen-activated protein kinase-1*

*Melan-A (MART-1): Melanoma Antigen Recognized by T-cells*

*MITF: factor de transcrição associado à microftalmia*

*MM: melanoma maligno*

*MMD: melanoma maligno desmoplásico*

*MMN: melanoma maligno neurotrópico*

*MPM-2: mitotic protein monoclonal 2*

*MRP: proteínas relacionadas com a melanogénese*

*MSH: hormonas estimulantes do melanócito*

*N-Cad: nerve cadherin*

*P16 (INK4A): inibidor de quinases dependentes das Ciclinas*

*P75-NGFR: neural growth factor receptor*

*pb: pares de bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos*

*PEComa: tumor da célula epitelióide perivascular*

*PI3K: quinase 3 fosfatidilinositol*

*PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*

*RB: gene da susceptibilidade para o retinoblastoma humano*

*RAS: RAS viral oncogene homolog*

*S: fase do ciclo celular que corresponde à síntese de ADN entre as fases G1 e G2*

*WNT: wingless-type MMTV integration site family member*

## CAPÍTULO 1

### **Introdução**

A interpretação de tumores melanocíticos é um dos mais importantes temas e provavelmente um dos desafios mais difíceis de toda a histopatologia cutânea, sobretudo quando se considera a indispensável correlação clínico-patológica. Os critérios de distinção entre nevo de Spitz e melanoma maligno (adiante referido como MM) nevíde (spitzóide), assim como os critérios diagnósticos de melanoma maligno desmoplásico (MMD), estes na base da justificação do presente trabalho, são alguns exemplos da dificuldade na interpretação de lesões melanocíticas.

Espera-se que o reconhecimento histológico seja correcto pelas potenciais consequências nefastas que podem advir para o doente em caso de erro diagnóstico. Interpretar um MM como nevo levará à ausência de procedimentos terapêuticos, com a previsível evolução para recidiva no local da biópsia, posterior metastização do MM e possível morte do paciente. Pelo contrário, diagnosticar como MM um vulgar nevo, além do dano psicológico que provoca, será provavelmente seguido de procedimento cirúrgico extenso, desnecessário, dissecação de gânglios linfáticos e eventualmente à utilização de tratamentos agressivos como radioterapia, imunoterapia e até quimioterapia. Em alguns países, é hoje em dia uma das principais causas de processos judiciais contra médicos.<sup>2</sup>

Para melhorar a acuidade diagnóstica dos tumores melanocíticos, tem-se assistido a um estudo contínuo das lesões melanocíticas com descrição minuciosa das suas características citológicas e arquiteturais. Assim, com recurso à histopatologia foi possível separar várias entidades clínico-patológicas de MM, onde se inclui aquele que é objecto do nosso estudo, MMD.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

Neste trabalho, após revisão bibliográfica sobre melanócito, MM e MMD, variedade de MM que levanta particulares dificuldades diagnósticas, passaremos à descrição das características clínicas, histológicas e imuno-histoquímicas observadas numa série de 113 doentes. Parte destes resultados foram publicados em 2008 no *American Journal of Dermatopathology*.<sup>3</sup> Como complemento do nosso estudo procedemos a uma análise estatística exploratória dos resultados.

## CAPÍTULO 2

### Melanócito

#### 2.1. Melanócito na pele normal

Os melanócitos têm origem ectodérmica, na crista neural, à semelhança das células do sistema nervoso, com as quais compartilham algumas características morfológicas e funcionais, enquanto que, as células pigmentadas da úvea têm origem no neuro-epitélio da vesícula óptica embrionária. Durante o primeiro trimestre da vida fetal os seus precursores migram da crista neural para a pele, leptomeninges e mucosas (esófago, vulva, colo do útero e ânus).<sup>4</sup> Na pele podem manter-se como células indiferenciadas, os melanoblastos,<sup>5</sup> ou diferenciarem-se em melanócitos adquirindo, assim, a capacidade de produzir melanina, que enviam para os queratinócitos vizinhos, através de prolongamentos dendríticos, o que determina a pigmentação da pele e dos pêlos. Na espécie humana os melanócitos encontram-se na pele, nos pêlos, na íris, na medula e zona reticular da glândula supra-renal, na *stria vascularis* do ouvido interno e nos neurónios pigmentados do sistema nervoso central, localizados no *locus ceruleus* e na *substantia nigra*.

MM pode, por este motivo, ocorrer em qualquer dos locais anatómicos em que existem melanócitos, como pele, úvea, mucosas oral e genital, tractos gastro-intestinal e genito-urinário, leptomeninges e gânglio linfático, com distintas propriedades de genética molecular e de prognóstico.<sup>6</sup>

A melanina, principal produto de síntese destas células, é um biopolímero com propriedades para-magnéticas, com origem na L-tirosina que, sob a acção de tirosinases, se transforma primeiro em dehidroxifenilalanina (DOPA) e seguidamente em dopaquinona:



## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

A dopaquinona pode combinar-se com cisteína por 2 vias em benzotiazinas e feomelaninas:

Dopaquinona + cisteína → 5-S-cisteinildopa → benzotiazina intermediária → feomelanina

Dopaquinona + cisteína → 2-S-cisteinildopa → benzotiazina intermediária → feomelanina

Alternativamente, a dopaquinona pode ser convertida em leucodopacromo e seguir uma de 2 vias para eumelaninas:

Dopaquinona → leucodopacromo → dopacromo → ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico → quinona → eumelanina

Dopaquinona → leucodopacromo → dopacromo → 5,6-dihidroxiindol → quinona → eumelanina

Diversos produtos intermediários da melanogénese têm potencial citotóxico, genotóxico e mutagénico.<sup>4,7</sup> O pigmento negro, denominado eumelanina actua como um sistema tampão, absorvendo e reflectindo a radiação ultravioleta solar sob a forma de calor, através de um processo foto-protector denominado “conversão interna ultra-rápida”, enquanto que o pigmento amarelo ou vermelho, denominado feomelanina pode amplificar os efeitos deletérios da radiação ultravioleta, como o poder mutagénico sobre o ADN, assim como a produção de radicais livres, contribuindo para a patogénese do MM e de outras neoplasias epiteliais cutâneas.

Os melanócitos da pele distinguem-se dos queratinócitos, elemento celular predominante da epiderme, tanto pelas suas características citológicas, como histológicas:

- Pelas suas características citológicas: contêm um núcleo mais pequeno e escuro, rodeado por um halo peri-nuclear claro, possuem prolongamentos dendríticos e localizam-se entre os queratinócitos da camada basal como células isoladas.
- Distribuem-se em todo o tegumento, com variações regionais da relação numérica melanócito/queratinócito na camada basal da epiderme, entre 1:4 (observada por exemplo, na pele dos genitais) até 1:10 (na região palmo-plantar).
- Localizam-se predominantemente na junção entre a epiderme e a derme, na porção superficial do epitélio folicular (acrotríquio), entre as células dos bulbos foliculares e na porção intraepitelial do ducto sudoríparo écrino (acrosiringio).

## MELANÓCITO

### 2.2. Melanócito nos nevos melanocíticos

A patogênese dos nevos melanocíticos tem sido discutida desde os primórdios da Dermatopatologia. Unna,<sup>8</sup> em 1893, apresentou o conceito de *abtropfung*, segundo o qual as células névicas melanocíticas desenvolvem-se primeiro na epiderme e caem (*drop off*), posteriormente, para a derme. Esta sequência explicaria o desenvolvimento sucessivo de lesões melanocíticas juncionais, compostas e finalmente intradérmicas. Unna também acreditava que as células névicas eram células puramente epiteliais. Actualmente, *abtropfung* só é usado como um modelo mecanicista simples, para explicar a localização das células névicas nas diferentes camadas da pele.

Observando os aspectos distintos da componente profunda dos nevos, Masson,<sup>9</sup> em 1951, propôs uma origem dupla para as células névicas, a partir de melanoblastos epiteliais indiferenciados (células névicas localizadas na epiderme e na derme superficial) e de células de Schwann (células névicas na derme profunda).

Desde os anos 40, do século XX, os progressos registados na embriologia experimental e na biologia celular levaram finalmente à descoberta de uma origem comum para os melanócitos, células névicas e células de Schwann, a partir da crista neural.

Mishima,<sup>10</sup> em 1965, introduziu o termo nevoblasto (ie, um estágio de indiferenciação em que a célula precursora derivada da crista neural já se encontra destinada -*committed*- a tornar-se célula névica). Observando as propriedades cito-químicas das células névicas na derme profunda, positivas para a colinesterase e negativas para a tirosinase, Masson<sup>9</sup> e Mishima<sup>10</sup> admitiram que estas células representavam uma linhagem distinta schwanniana.

Em 1984, o patologista americano Cramer,<sup>11</sup> postulou a existência de uma relação citogenética íntima entre as células melanocíticas e as células peri-neurais baseado nos achados imuno-histoquímicos e de microscopia electrónica. Colocou a hipótese de que, durante a embriogénese, células precursoras derivadas da crista neural atingiriam a pele através dos nervos cutâneos provenientes dos gânglios para-espinhais. Cramer sugeriu então que o conceito de *abtropfung* deveria ser substituído pelo conceito de *hochsteigerung* (trepador), significando uma migração “para cima”, dos melanócitos, semelhante aos acontecimentos embriológicos como parte da manutenção dos tecidos após o nascimento. Interpretou o fenómeno dos nevos recorrentes, que surgem após excisão cirúrgica incompleta, como uma prova deste conceito.

Observando o desenvolvimento dos nevos melanocíticos adquiridos, Cramer<sup>12</sup> sugeriu o seguinte: em resposta a um aumento de produção de melanócitos pelos nevos (*ie*, a partir do lado dérmico), a epiderme tentaria manter constante a relação melanócitos/queratinócitos aumentando o número de queratinócitos, nas novas unidades melanocíticas epiteliais supranumerárias. Como a capacidade de resposta da epiderme é limitada, haveria, com o tempo, uma diminuição na maturação dos melanócitos, com a sua acumulação em ninhos na junção dermo-epidérmica. A proliferação mantida, associada com um bloqueio à entrada de novos melanócitos na epiderme, levaria à acumulação de grande número de células névicas na derme.<sup>12</sup>

De salientar que Krengel<sup>13</sup> considera que as células precursoras melanocíticas, conforme amadurecem, perdem a capacidade de atravessar a membrana basal epitelial, denominando este processo como bloqueio epitelial de entrada. Na sequência dos trabalhos referidos aceita-se actualmente que a célula névica e a célula de MM representam o mesmo tipo celular, o melanócito.

Numa perspectiva morfológica, os melanócitos são divididos classicamente em 3 categorias, de acordo com a relação entre o tamanho do núcleo e do citoplasma e com a forma da célula, em epitelióides, linfóides e fusiformes. Nos primeiros, epitelióides, a relação núcleo/citoplasma é de aproximadamente 1:1, com um núcleo grande e um citoplasma vasto e eosinofílico, como observado no nevo de Spitz. Nos segundos, linfóides, predomina o núcleo com ausência quase total do citoplasma, tomando as células a cor azul na coloração de rotina pela hematoxilina e eosina, assemelhando-se a linfócitos. O último grupo, dos melanócitos fusiformes, corresponde a células compridas e bipolares, algumas em onda, assemelhando-se a pequenas fibras nervosas. Nos nevos melanocíticos compostos, congénitos e adquiridos, é frequente observarmos os 3 subtipos de melanócitos da superfície para a profundidade.

### 2.3. Transformação maligna do melanócito

Na transformação de um melanócito normal para um melanócito neoplásico maligno, quer seja directamente (“de novo”), quer seja após a sua passagem pela fase de melanócito neoplásico benigno (nevo melanocítico), ocorrem alterações moleculares e cromossómicas, primárias e secundárias.<sup>14:15</sup> O melanócito normal evoluirá directamente para melanócito

## MELANÓCITO

neoplásico maligno, em cerca de 70 a 80% dos casos. O melanócito normal evoluirá para melanócito neoplásico benigno e, este, para melanócito neoplásico maligno, em cerca de 20 a 30% dos casos.<sup>16</sup>

Os factores que influenciam o desenvolvimento e a progressão para MM incluem:

- Iniciação tumoral (mutações, perda de heterozigotia, amplificação de genes, ganho e perdas de cromossomas).
- Crescimento tumoral (perda do controle do ciclo celular, factores de crescimento, neo-vascularização).
- Resistência à apoptose (inactivação dos processos de morte celular, ganho de factores anti-apoptóticos e de sobrevivência).
- Invasão e metastização (mobilidade celular, adesão celular, enzimas proteolíticos).
- Fuga da vigilância imunológica (perda ou ganho de reguladores imunológicos).<sup>17-19</sup>

Ao contrário do que acontece em muitos outros cancros, mutações nos genes *TP53*, *RB*, *PTEN* ou *RAS* parecem ser relativamente raras nos MM, enquanto que mutações do *BRAF*, as quais atingem a MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e perda da função de P16/p14ARF são detectadas na maioria dos MM.<sup>20,21</sup>

Alterações não só de desregulação da transição das fases de proliferação celular G1→S, como activação dos processos de sinalização, à semelhança do que ocorre na transformação melanoblasto → melanócito são observadas na patologia do MM. Especificamente, sinalização por receptor tirosina quinase (C-KIT), o WNT (*wingless-type MMTV integration site family member*), a melanocortina (MSH-alfa / receptor melanocortina 1 / AMPc) e perda do inibidor da quinase dependente da Ciclina P16-INK4A são processos que alteram a expressão ou função de MITF, que é um factor essencial no desenvolvimento e sobrevivência dos melanócitos.<sup>20,22</sup>

O aumento de WNT5a nos MM humanos está associado com um fenótipo mais agressivo<sup>23</sup> e a expressão do ligando WNT correlaciona-se com os achados histológicos.<sup>24</sup>

A diminuição de PTEN ou a activação do oncogene RAS parece funcionar de maneira recíproca, ambos cooperando com a perda da função P16, contribuindo para a progressão para MM.<sup>25</sup>

De todos os processos de sinalização, a cascata MPAK (RAS→BRAF→MEK→ERK→MPA), envolvida no controle do crescimento celular, sobrevivência celular e invasão, parece ter um papel muito importante no comportamento do MM.<sup>26</sup> Mutações afectando o *BRAF*, a maioria no domínio quinase (80% em V600E<sup>1</sup>) foram encontradas em mais de 50% dos MM (uma percentagem semelhante é também encontrada nos nevos melanocíticos não-Spitz).<sup>21;28;29</sup>

As aberrações moleculares no MM em geral são heterogéneas e complexas, podendo correlacionar-se com a agressividade da neoplasia e com a diminuição da sobrevivência.<sup>21</sup> Exemplo de diversidade da patologia molecular inclui o caso dos MM oculares em que a mutação *BRAF* nunca ocorre,<sup>30;31</sup> nem a associação com variantes de genes *CDKN2A* e *MC1R*.<sup>32</sup> O MM acral mostra amplificações genéticas frequentes e precoces.<sup>33;34</sup> O MM sobre lêntigo maligno tem significativamente mais ganhos e perdas de 15q, 17q/13q e 17p do que o MM de crescimento superficial e do que o MM nodular.<sup>34</sup> O MM com um perfil de mutações P16 / *ARFΔ* + *BRAF* / *RAS* está associado com uma maior sobrevivência, ao contrário dos que contêm perfis mutagénicos mais complexos.<sup>35</sup>

Curtin, Bastian e col.<sup>6</sup> descobriram padrões totalmente distintos de alterações de ADN em MM com localizações anatómicas diferentes, independentemente do seu tipo histológico. Utilizando hibridização genómica comparativa (HGC) conseguiram distinguir MM localizados em pele com e sem dano actínico crónico.

Dados epidemiológicos e experimentais suportam fortemente o papel da radiação actínica (particularmente a queimadura solar em idades jovens) no desenvolvimento de MM, apesar de não se ter ainda descoberto uma mutação genética constante e específica da exposição à radiação ultra-violeta.<sup>36;37</sup> O facto pode apenas significar que outros mecanismos para além da absorção desta radiação pelo ADN serão os responsáveis. A feomelanina, abundante nas pessoas ruivas, pode induzir a formação de radicais livres, que danificam o ADN. Foi também sugerido que a resposta dos melanócitos à radiação ultra-violeta depende da sua localização anatómica.<sup>38;39</sup>

A informação de que dispomos actualmente é consistente com a existência de diferentes vias de alterações genéticas na origem dos MM. A probabilidade de que um melanócito siga um

---

<sup>1</sup> A alteração da designação V599E para V600E resultou da dificuldade na sequenciação do exão 1 (rico em G-C) do gene *BRAF*. A sequenciação foi actualizada no dia 24 de Julho de 2003, com a inserção de 3 pb no código sequencial, o que resultou no aumento do comprimento da proteína *BRAF* em 1 amino-ácido.<sup>27</sup>

## MELANÓCITO

determinado trajecto para a malignidade é provável que seja o corolário de uma complexa interação de factores relacionados com a anatomia, a hereditariedade e o ambiente. O padrão geral de mutações, activação e perda de genes oncogénicos sugere que os MM tendem a adquirir alterações genéticas que, apesar de diversas, têm efeitos convergentes nos ciclos bioquímicos chave.<sup>40</sup>

Estas diferenças nos genótipos dos diferentes MM salientam a necessidade da realização de estudos mais extensos e aprofundados que ajudem na descoberta de marcadores moleculares que melhorem a acuidade diagnóstica, a previsão prognóstica e que permitam o desenvolvimento de terapêuticas individualizadas.<sup>15;34;35;41</sup>



### Melanoma Maligno

#### 3.1. Conceito e definições

O melanoma maligno corresponde a uma neoplasia maligna de melanócitos.

Na pele, inicia-se habitualmente na epiderme a partir de mutação ocorrida em melanócito aí localizado. É denominado MM *in situ* enquanto se encontra confinado à epiderme, incluindo-se nesta o epitélio anexial, dos folículos pilosos e das glândulas sudoríparas. Esta fase em que o crescimento do MM é apenas intra-epitelial e em que não existe risco de metastização, em virtude de o epitélio carecer de vasos sanguíneos e linfáticos, denomina-se de crescimento radial (FCR).

O passo seguinte na evolução do MM corresponde à invasão da derme e denomina-se fase de crescimento vertical (FCV). Este é o passo mais importante, pois é a partir deste momento que o MM se torna realmente “maligno”, uma vez que ganha a possibilidade de metastizar para tecidos e órgãos distantes. Esta fase de mobilidade celular requer que ocorram sequencial e repetidamente fenómenos celulares de extensão, adesão/re-adesão e contracção.<sup>42</sup>

Como foi atrás referenciado, só em cerca de um quinto dos casos o MM tem origem em lesão melanocítica benigna prévia. Estão descritos MM surgidos em nevos congénitos, principalmente nos denominados congénitos gigantes, quando o seu maior eixo é superior a 20 cm e também em nevos adquiridos, quer seja em nevos displásicos, como muito raramente em nevos azuis. Não há nenhuma descrição convincente de que MM tenha ocorrido em nevo de Spitz prévio.<sup>43</sup>

MM também pode ocorrer em cicatriz secundária a queimadura “antiga”.<sup>44;45</sup>

Foi descrita a ocorrência de MM em área de radioterapia prévia<sup>46;47</sup> e em área de linfedema pós-radioterapia.<sup>48</sup>

Estão descritos casos de MM em doentes com imunodeficiência associada ao vírus VIH,<sup>49</sup> pós-transplante<sup>50</sup> ou com linfoma.<sup>51</sup>

MM é clinicamente rotulado de “maligno” pelo seu elevado potencial de metastização. À semelhança de todas as neoplasias malignas, esta pode efectuar-se não só por invasão local dos tecidos vizinhos, como por disseminação linfática ou vascular.

### 3.2. Critérios de diagnóstico

O diagnóstico de MM continua a assentar essencialmente na correlação entre a clínica e a observação microscópica de cortes histológicas representativos de todo o tumor, corados por hematoxilina e eosina (H&E). Actualmente não existe nenhum marcador 100% específico e sensível para o diagnóstico de MM que nos permita substituir o exame histológico de rotina.

#### 3.2.1. Critérios clínicos de diagnóstico

O MM consiste habitualmente numa mancha hiperpigmentada, única, que evolui progressivamente para pápula e posteriormente para tumor e faz parte da chamada lista dos tumores negros cutâneos (Quadro 1).

A cor homogénea da lesão inicial, com o tempo vai ganhando várias tonalidades como negro, castanho-escuro, castanho-claro, vermelho, azul e cinzento. Os bordos que começam por ser regulares, vão-se tornando irregulares, assim como a superfície que de início é lisa, pode alternar áreas atróficas, com eventual ulceração secundária e áreas verrucosas.

## MELANOMA MALIGNO

**Quadro 1. Diagnóstico diferencial dos tumores negros cutâneos<sup>52</sup>**

---

–	Estrutura melanocítica
	Nevos e tumores melânicos
–	Estrutura malpighiana
	Verruga seborreica
	Verrugas hemorrágicas
	Nevo epidérmico verrucoso
–	Estrutura epitelial anexial
	Basalioma pigmentado
	Hidrocistoma negro
–	Estrutura vascular
	Equimose subungueal
	Angioma trombosado
	Angioma queratósico
	Tumor glómico
	Sarcoma de Kaposi nodular
–	Estrutura histiocitária
	Histiocitofibroma hemossiderótico

---

No estudo de uma lesão melanocítica é classicamente utilizado o acrónimo ABCDE, cujas letras correspondem às iniciais de: Assimetria, Bordo irregular, Cor variada, Diâmetro superior a 6 mm e Elevação. Importa referir que o limite de 6 mm é arbitrário, podendo o diagnóstico de MM ser efectuado em lesões de diâmetro inferior. Ackerman<sup>53</sup> sugere que se acrescente ao acrónimo a letra F de *Flat* (liso, plano) pois como é sabido as lesões elevadas de MM têm potencial metastático, enquanto que, as lesões na fase de mancha, em regra, não metastizam. Esta regra é simplista, não se aplica ao estudo de lesões melanocíticas de pequenas dimensões, não faz menção das características da superfície tumoral, nem regista a presença ou ausência de regressão.

O aparecimento dentro do perímetro da lesão melânica de área de hipopigmentação poderá resultar de fenómeno imunológico de regressão. Este pode corresponder histologicamente a resposta inflamatória com fibrose, melanose ou às duas simultaneamente. A área castanha é devida à presença de melanócitos anormais na epiderme e na derme, contendo quantidades variadas de melanina, associados com melanófagos, de distribuição e densidade irregular; enquanto que a área hipopigmentada, corresponde à combinação de 3 factores –

diminuição da melanina epidérmica, fibroplasia de uma derme papilar espessada e presença de linfócitos e melanófagos, presentes em quantidade variável junto à base da zona de fibrose.

Na semiologia clínica do MM que surge em lesão melanocítica prévia deve ser valorizado não só o aparecimento de áreas de hipopigmentação, como também o prurido, a hemorragia e a ulceração.

O MM surge sobretudo em indivíduos caucasóides, com mais de 40 anos de idade, sendo raro na puberdade e excepcional nas crianças, sem predomínio de sexo.<sup>52</sup>

O lântigo maligno (LM), classicamente designado também como melanose pré-cancerosa de Dubreuilh é uma mancha de tonalidade variada, do acastanhado ao negro, que surge em pele com dano actínico crónico, localizada habitualmente na face de idosos e que corresponde a MM *in situ*.

Quando surge uma pápula ou um nódulo sobre esta mancha pigmentada prévia significa que a lesão deixou de ser exclusivamente intraepidérmica, pois invadiu a derme, tendo-se dado início à fase de crescimento vertical (FCV).<sup>53</sup> Nesta fase o MM denomina-se MM sobre lântigo maligno.

O MM acrolentiginoso surge nas extremidades e tem um interesse acrescido nas raças não caucasóides. Esta variedade de MM não parece estar em relação com a radiação actínica.

O MM é amelanótico quando contém nenhum (ou pouco) pigmento melânico, o que dificulta o seu diagnóstico clínico. Localiza-se preferencialmente na face de idosos e está associado habitualmente com padrão histológico de desmoplasia, constituindo o grupo de MM de que nos ocuparemos neste estudo, o denominado MMD.<sup>54</sup>

### 3.2.2. Critérios histológicos de diagnóstico

O diagnóstico histológico de MM baseia-se na ponderação do somatório de um conjunto de critérios histológicos, utilizados em grupo. A selecção dos critérios a utilizar no estudo de lesões melanocíticas tem sido efectuada ao longo do tempo pelo estudo microscópico exaustivo de lesões inequívocas de MM.<sup>55</sup>

Os critérios, desejavelmente objectivos, podem não ser avaliados da mesma maneira por observadores distintos, o que origina discrepâncias diagnósticas.<sup>56</sup>

## MELANOMA MALIGNO

No sistema de diagnóstico efectuado com base em critérios de malignidade e benignidade recorre-se ao emparelhamento de entidades histológicas bem definidas, permitindo a realização sequencial de diagnósticos diferenciais.<sup>57</sup>

Como critérios de malignidade<sup>58</sup> a avaliar destacam-se:

- Grandes dimensões da lesão.
- Silhueta assimétrica.
- Assimetria dos limites laterais na junção dermo-epidérmica.
- Assimetria na distribuição dos melanócitos isolados e dos ninhos na junção.
- Assimetria da distribuição de pigmento dentro da lesão.
- Assimetria na distribuição da resposta inflamatória.
- Assimetria das alterações epidérmicas.
- Assimetria dos pormenores citológicos.
- Má delimitação da lesão.
- Confluência de grandes ninhos melanocíticos.
- Nódulos expansivos e padrão de crescimento sólido.
- Atipia celular.
- Pleomorfismo citológico e figuras de mitoses.
- Disseminação epitelial pagetóide.
- Localização em área de elastose solar.

### 3.3. Tipos

Em perspectiva clínico-patológica, os MM encontram-se divididos classicamente em 4 tipos, como referido atrás:

- MM de crescimento superficial.
- MM sobre léntigo maligno.
- MM nodular.
- MM acrolentiginoso.

MM de crescimento superficial é a variedade mais frequente de MM em caucasianos, podendo localizar-se em qualquer parte do tegumento cutâneo, principalmente em áreas de exposição solar intermitente.

MM sobre lântigo maligno ocorre em áreas com dano actínico crónico intenso. Habitualmente presente em idosos caucasóides, observa-se frequentemente já em fase de crescimento vertical.

MM nodular corresponde a um nódulo de crescimento rápido, habitualmente pigmentado que ulcera e sangra. Histologicamente ocupa lateralmente apenas 1 ou 2 papilas dérmicas, mas é diagnosticado habitualmente numa fase de grande espessura, pois apenas ocorre fase de crescimento vertical. Localiza-se habitualmente nos membros.

MM acrolentiginoso ocorre nas palmas e plantas ou em localização subungueal. Neste caso inicia-se quase sempre no leito ungueal ou no sulco peri-ungueal, com posterior destruição da unha. É a forma de MM que ocorre com maior prevalência nos indivíduos de fototipos altos, como africanos e asiáticos.

Encontram-se descritas, também, algumas variedades clínico-patológicas mais raras como:

- MM das mucosas.
- MM ulcerado.
- MM verrucoso.
- MMD, de que nos ocuparemos neste estudo.

### 3.4. Incidência, prevalência e mortalidade

A incidência e a prevalência do MM variam com os factores de risco pessoais e ambientais. Como factores de risco pessoais podemos enumerar características próprias a cada indivíduo como a idade, história pessoal ou familiar de MM,<sup>59</sup> presença de potenciais lesões precursoras de MM (como grande número de nevos displásicos e até de nevos comuns<sup>60;61</sup>), a susceptibilidade da pele ao Sol<sup>62</sup> e, a presença de indicadores de dano actínico crónico. Como

## MELANOMA MALIGNO

exemplos de factores de risco do ambiente, a estadia em locais de maior exposição à radiação ultravioleta (menor latitude e maior altitude), principalmente na infância.<sup>63;64</sup>

A incidência maior ocorre na população branca do continente australiano, seguida do continente norte-americano e da Europa setentrional com taxas de incidência padronizadas por idade, por 100 000 habitantes e por ano de 37.7, 16.4 e 8.4 para o sexo masculino e de 29.4, 11.7 e 10.0 para o sexo feminino, respectivamente.<sup>65</sup> Nos Estados Unidos da América a incidência de MM entre a população branca é cerca de 20 vezes superior à observada na população negra.<sup>66</sup> Em Portugal não existem estatísticas fidedignas da sua ocorrência.

À escala mundial podemos afirmar que no ano 2000, o MM foi a 16.<sup>a</sup> neoplasia maligna mais frequentemente diagnosticada no sexo masculino e a 15.<sup>a</sup> no feminino. Na Austrália e na Nova Zelândia correspondeu às 4.<sup>a</sup> e 3.<sup>a</sup> causas mais frequentes de neoplasia maligna, respectivamente para os sexos masculino e feminino.<sup>67</sup>

O papel etiológico da exposição intermitente à radiação ultravioleta nas queimaduras solares em idades jovens, ficou demonstrado com a comparação das incidências de MM registadas entre as duas primeiras gerações de ingleses a colonizar a Austrália. A 1.<sup>a</sup> geração apenas chegou à Austrália já na idade adulta e a incidência de MM foi igual à do país de origem (Inglaterra) enquanto na geração dos seus filhos nascidos na Austrália, a incidência de MM foi igual à dos Australianos.<sup>68;69</sup> Este dano actínico intermitente, especialmente quando ocorrido em idades jovens,<sup>70</sup> estaria relacionado com o MM de extensão superficial, enquanto que o dano actínico crónico estaria na origem do MM sobre lântigo maligno.<sup>71;72</sup>

Nos casos de MM acral<sup>73</sup> ou das mucosas é difícil de entender a acção patogénica da radiação ultravioleta na sua origem. Os MM subungueais representam cerca de 20% dos MM observados nas pessoas de pele escura, incluindo nestas as populações orientais, enquanto que correspondem a 2% na população branca.<sup>74</sup> Num estudo de 406 MM subungueais publicado em 2002,<sup>75</sup> a localização preferencial do MM foi no 1.<sup>o</sup> dedo, tanto das mãos (58% no dedo polegar), como dos pés (86% no *hallux*). Estes autores sugerem como causa mais provável deste tipo de MM o traumatismo. O MM nas mucosas pode ocorrer na mucosa oral (representa menos de 1% de todos os MM) em que para além do possível papel do traumatismo mecânico, foi valorizada a exposição ao formaldeído.<sup>76</sup>

Apesar de se ter assistido a um aumento progressivo da incidência de MM, não se confirmou a previsão feita nos anos 70 de um aumento acentuado de novos casos de MM,<sup>77;78</sup> em que se chegou a avançar a possibilidade da duplicação de novos casos de MM na população

européia, a cada 1 ou 2 décadas.<sup>79</sup> O aumento da taxa de incidência ocorreu principalmente nas áreas de pele expostas intermitentemente ao Sol, como o tronco nos homens e as pernas e braços nas mulheres.<sup>64</sup> Nos Países com maior taxa de novos casos de MM como os Estados Unidos, a Austrália e a Europa do Norte, a incidência atingiu o seu pico nos anos 80, vindo a observar-se desde essa altura, um decréscimo, principalmente nos jovens, ao contrário do que ocorre na Europa do Sul, Europa do Leste e na América Latina em que as taxas de incidência ainda se encontram a crescer.<sup>64</sup> Paralelamente também foi previsto vir a ocorrer um acentuado aumento da taxa de mortalidade,<sup>80</sup> mas pelo contrário, esta taxa tem vindo a diminuir, aparentemente não por qualquer avanço na terapêutica do MM, mas talvez ao facto de se realizar mais precocemente o seu diagnóstico.<sup>64;81-83</sup>

### 3.5. Caracterização histológica

Cerca de 90% de todos os MM têm na sua constituição um compartimento intraepitelial não-tumorigénico (fase de crescimento radial), e metade destes MM têm um foco tumorigénico (fase de crescimento vertical); enquanto cerca de 10% dos MM, denominados nodulares, têm apenas um compartimento tumorigénico.<sup>65</sup>

Nesta perspectiva seguimos a classificação de MM, adaptada da classificação de tumores cutâneos publicada pela OMS<sup>64;65</sup> (Quadro 2).

No componente intraepitelial dos MM, também denominado *in situ*, dois padrões não tumorigénicos *major* podem ser distinguidos: pagetóide e lentiginoso.<sup>84</sup> O padrão lentiginoso recorda a distribuição regular de melanócitos dispostos na camada basal como no léntigo simples, mas em que a proliferação de melanócitos ao longo da camada basal da epiderme é contínua e uniforme, ocupando, pelo menos focalmente, a região entre as cristas epidérmicas. A disseminação pagetóide é descrita graficamente como a disposição dos melanócitos em vários níveis da epiderme, comparada a “tiros de metralhadora”. Neste padrão os melanócitos maiores agrupam-se habitualmente em tecas nas camadas inferiores da epiderme e de forma isolada nas camadas superiores da epiderme. Em muitos MM, tal como em nevos, tecas de melanócitos estão presentes na junção dermo-epidérmica, mas tendem a ter tamanhos e formas variadas, orientação horizontal e disposição espacial irregular, podendo observar-se confluência e fusão

## MELANOMA MALIGNO

de ninhos vizinhos. A epiderme que recobre o tumor tem espessura irregular, alternando áreas de espessamento com áreas de atrofia, podendo esta ser tão marcada que origine ulceração.

### Quadro 2. Classificação histológica do melanoma maligno

---

#### Fase de crescimento radial (FCR) ou MM não tumorigénico

- *In situ* ou microinvasivo:
  - MM de crescimento superficial: 67% de todos os MM
  - MM sobre lénigo maligno: 9%
  - MM acrolentiginoso: 4%
  - Atipia melanocítica não classificável, em FCR: 5%

#### Fase de crescimento vertical (FCV) ou MM tumorigénico

- Sem compartimento FCR: 10%
    - MM nodular
  - Com compartimento FCR: 90%
    - Fase de crescimento vertical habitual: 96%
    - MMD: 3%, a maioria é também neurotrópico (MMN)
    - MMN não desmoplásico: 1%
    - Outras variedades mais raras de MM incluem MM nevíde/desvio mínimo, MM de células balonizadas, MM amelanótico, MM de células fusiformes, nevo azul maligno, MM em nevo congénito, sarcoma de células claras, schwannoma melanocítico maligno: não existem estatísticas da sua frequência.
- 

O compartimento tumorigénico, ou fase de crescimento vertical, corresponde à invasão da derme pelas células de MM. Os seus aspectos histológicos variam conforme o tipo de MM observado, mas têm também características citológicas e arquiteturais comuns que vamos enumerar adiante.<sup>85</sup>

No plano citológico, os melanócitos são por vezes uniformes, mas têm citoplasma vasto, que contém quantidades variadas de melanina, consistindo esta em pequenos grânulos, tipo poeira (*dusty*). Quase sempre estas células são desprovidas de dendritos visíveis. Os núcleos são habitualmente grandes e hipercromáticos, com membrana nuclear irregular e contêm acúmulos irregulares de cromatina. Esta atipia citológica uniforme tem grande importância diagnóstica,

tal como a observação de mitoses em melanócitos localizados nas camadas profundas da lesão melanocítica.<sup>65</sup>

Para se efectuar o diagnóstico de lesão melanocítica maligna, em contraponto ao de nevo, é importante valorizar no plano arquitectural: maior dimensão da lesão, assimetria e limites laterais mal definidos constituídos por melanócitos isolados dispostos irregularmente e não por tecas. Na fase de crescimento vertical é de valorizar a ausência de maturação dos melanócitos desde a superfície para a profundidade, figuras de mitose na derme e ninhos de melanócitos intradérmicos maiores do que a maior teca intraepitelial. É constante a presença de melanófagos e de infiltrado inflamatório. Predominantemente constituído por linfócitos, o infiltrado inflamatório pode ser apenas focal e perivascular, mas é muitas vezes denso e disposto em banda, principalmente nas lesões invasivas. A distribuição do pigmento melânico tende a ser assimétrica e localizar-se preferencialmente na base da lesão.<sup>86</sup>

Uma grande variedade de achados citomorfológicos, padrões arquitecturais e alterações no estroma foram descritas em MM. Por vezes os MM mimetizam carcinomas, sarcomas, tumores benignos do estroma, linfomas, plasmocitomas ou tumores de células germinativas. Existem MM que são constituídos por células pleomórficas grandes, células pequenas e células fusiformes. Os MM podem conter células claras, em anel de sinete, pseudolipoblásticas, rabdóides, plasmocitóides ou balonizantes. Material fagocitado e variadas inclusões estão ocasionalmente presentes no seu citoplasma. Os núcleos, por vezes bi- ou multinucleados, podem conter inclusões e ser lobulados, festonados ou angulosos. As variações arquitecturais incluem fasciculação, enrolamento (*whorling*), tecas, trabeculação, aspectos pseudo-glandulares, pseudo-papilares, pseudo-foliculares, pseudo-rosetas e padrões angiocêntricos. Foram descritos no estroma áreas mixóides, desmoplásicas e mais raramente aspectos de pseudo-angiosarcoma, de inflamação granulomatosa e de resposta de células gigantes osteoclástica. Os vasos no estroma têm por vezes, um aspecto semelhante a hemangiopericitoma, proliferação de vasos glomerulóides ou hialinização perivascular. Por vezes, observa-se diferenciação para estruturas não-melanocíticas – schwanniana, fibro/miofibroblástica, osteocartilagínea, muscular lisa, rabdomioblástica, gangliocítica e gangliocítica-neuroblástica.<sup>87</sup>

## MELANOMA MALIGNO

### 3.6. Caracterização imuno-histoquímica

O estudo histológico dos tumores melanocíticos baseia-se na coloração clássica por hematoxilina e eosina, de alta qualidade, efectuada em múltiplos cortes finos representativos de toda a peça tumoral. Esta deve ser excisada na sua totalidade para permitir um estudo exaustivo das suas características citológicas e arquitecturais. A maioria dos MM não necessita de estudo imuno-histoquímico para o seu diagnóstico, no entanto, o MM de células fusiformes (em que se inclui o MMD) e o MM metastático requerem a sua utilização, para uma melhor acuidade e confirmação diagnósticas. Anticorpos como a vimentina e a proteína S100 marcam virtualmente todos os MM e todos os nevos melanocíticos. Contudo, nenhum anticorpo usado isoladamente é específico de proliferação melanocítica e muito menos de proliferação melanocítica maligna.

Para o estudo imuno-histoquímico de um MM recorre-se a marcadores utilizando anticorpos mono- e policlonais de vários tipos (ver adiante, Quadro 13) agrupados em:

- Marcadores de diferenciação melanocítica.
- Marcadores de progressão e sinalização tumoral.
- Marcadores de células do estroma.
- Outros marcadores.

#### 3.6.1. Marcadores de diferenciação melanocítica

O MM caracteriza-se, do ponto de vista imuno-histoquímico, pela positividade das células que o constituem para marcadores de diferenciação melanocítica que marcam as células sintetizadoras de melanina, tanto de lesões melanocíticas benignas como malignas.

Como não existe nenhum marcador isolado que tenha uma sensibilidade de 100%, e que seja concomitantemente 100% específico para melanócitos, é necessário efectuar sempre um painel com alguns destes marcadores – S100, HMB-45, Melan-A, Tirosinase, MITF, CD-117 e P75. Todos estes marcadores são citoplasmáticos, com ou sem concomitante marcação nuclear ou de membrana, com excepção do MITF cuja marcação é exclusivamente nuclear (Quadro 3.)

MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

Quadro 3. Características de alguns marcadores de diferenciação melanocítica<sup>88</sup>

MARCADOR	CC	CÉLULAS MARCADAS	TUMORES MARCADOS
<b>S100</b>	N+C	Melanócitos, adipócitos, glândulas écrinas e apócrinas, células de Langerhans, células gliais e de Schwann, condrócitos, células mioepiteliais, células reticulares do gânglio linfático, macrófagos.	MM, sarcoma de células claras, schwannoma (negativo em 40-50% dos S. malignos), <sup>89</sup> histiocitose de células de Langerhans, astroglioma, tumor de células granulosas, cordoma, epidendimoma, mioepitelioma, tumores dos anexos cutâneos, tumores salivares, condroma e condrossarcoma, lipoma e lipossarcoma, sarcomas histiocíticos, e alguns carcinomas (p.e., mama, ovário, endométrio, tiróide).
<b>HMB-45</b>	C	Melanócitos fetais e alguns melanócitos normais superficiais do adulto, pigmento do epitélio retiniano. Melanófagos também podem ser positivos.	MM (epitelióide), sarcoma de células claras, PEComa, tumores associados com a tuberculose esclerosa e schwannoma melanótico.
<b>Melan-A (MART-1)</b>	C	Melanócitos da pele, úvea e retina. Melan-A é também positivo no córtex supra-renal, células ováricas da granulosa e da teca, células de Leydig. Negativo nos melanófagos.	MM (raro nos MM de células fusiformes e nos MMD). Micrometástases ganglionares de MM. PEComas. Tumores do córtex supra-renal, de células de Leydig e de células granulosas.
<b>Tirosinase</b>	C	Enzima envolvida nos estádios iniciais da biosíntese de melanina sendo por isto positiva nas células com diferenciação melanocítica. Células névicas são fortemente positivas na junção dermo-epidérmica, diminuindo a intensidade da marcação quando caminhamos para a profundidade.	84% dos MM metastáticos. Padrão homogêneo nos estádios precoces de 94% dos MM. Negativo na maioria dos MMD.
<b>MITF</b>	N	Proteína ligada ao ADN que regula a transcrição dos genes envolvidos na síntese de melanina, como a tirosinase. Quatro isoformas humanas: A e B (retina, cancro do colo do útero e MM), H (retina e cancro do colo do útero, mas negativa nos MM) e M (positiva só nas células de MM).	Positiva nos nevos, em 76% dos MM e em 88% dos MM metastizados. Entre 3 e 55% dos MMD em relação com o tamanho do tumor <sup>90;91</sup> PEComas. Outros tumores com diferenciação melanocítica: schwannoma melanótico, nevo azul celular e sarcoma de células claras.
<b>C-KIT (CD117)</b>	C, M	Mastócitos, melanócitos intraepidérmicos, 4% das células mononucleares da medula óssea.	Alguns MM, GIST (+) versus leiomiomas (-) e schwannomas (-), Mastocitose. LMA (mais de 50%) e LMC nas crises blásticas mielóides.
<b>P75-NGFR</b>	C	Nervos cutâneos.	Tumores com diferenciação para a bainha nervosa: 100% dos MMD, 60% dos MM epitelióides. Schwannoma.

Ac, anticorpo; Ag, antígeno; C, citoplasma; CC, componente celular; GIST, tumor do estroma gastrointestinal; LMA, leucemia mielóide aguda; LMC, leucemia mielóide crónica; M, membrana celular; N, núcleo; PEComa, tumor da célula epitelióide perivascular.

## MELANOMA MALIGNO

**S100** é uma proteína ácida de 21 kDa, com ligação ao cálcio e zinco, descoberta inicialmente nas células gliais.<sup>92;93</sup> É assim denominada por ser solúvel em solução saturada a 100% de sulfato de amónio, a pH neutro.<sup>94;95</sup> É o marcador de MM mais sensível, com marcação nuclear e citoplásmica em 97-100% dos casos.<sup>95-97</sup> A especificidade da proteína S100 para as lesões melanocíticas, tanto malignas como benignas, varia entre 75-87%, podendo ser expressa em células das bainhas nervosas, células mioepiteliais, adipócitos, condrócitos e células de Langerhans.<sup>98;99</sup>

Em 2005, o *website* de Dennis Frisman<sup>100</sup> referiu 62 tumores não-melanocíticos para os quais a sensibilidade para S100 foi de 100% e 135 tumores não-melanocíticos para os quais sensibilidade para S100 foi de 50%.<sup>101</sup> Mesmo as células fusiformes, nas cicatrizes dérmicas recentes, podem expressar S100, uma “armadilha” diagnóstica na avaliação de reexcisão de MM, especialmente no caso de MMD.<sup>102-104</sup> As suas aplicações mais úteis são no diagnóstico de MM de células fusiformes e desmoplásico, na distinção entre melanócitos e linfócitos em halo nevo, no diagnóstico diferencial entre queratoses actínicas pigmentadas e lêntigo maligno e no diagnóstico de metástases cutâneas pouco diferenciadas. As sub-unidades A e B têm significado diagnóstico e prognóstico, respectivamente. Assim a expressão de S100A6 pode distinguir nevo de Spitz de MM,<sup>105</sup> enquanto um aumento serológico de S100B, no sangue de doentes com MM, parece indicar um risco aumentado de metástases.<sup>106;107</sup>

**HMB-45**, marcador citoplasmático da glicoproteína gp 100 dos pré-melanossomas, foi dos primeiros marcadores “específicos” de MM.<sup>108</sup> Estão publicadas séries, que apontam sensibilidades para MM, que variam entre 69 e 93%.<sup>95;96;109-114</sup> A sua expressão é maior nos MM primários (77-100%) e menor nas metástases (58-83%). Habitualmente, a marcação é mais intensa no componente epidérmico dos MM, com diminuição gradual de intensidade conforme se caminha para a profundidade do MM. Devemos recordar que existem neoplasias benignas de melanócitos em que a marcação na derme por HMB-45 se pode observar, tais como *deep penetrating nevus*, nevo de tipo A invertido, nevo azul ou nevos combinados, no entanto o diagnóstico diferencial é feito com recurso à silhueta em H&E. É discutível se a marcação por HMB-45 é menos sensível nos MM amelanóticos.<sup>95;109</sup> HMB-45 é um marcador melanocítico muito específico, apesar de também poder ser positivo em tumores de pericitos epitelióides, angiomiolipomas, linfangiomatose, alguns tumores pulmonares de células claras, tumores das glândulas sudoríparas, melanocitomas meníngeos, sarcoma de células claras dos tendões e

aponevroses, alguns tumores de células esteróides do ovário, alguns tumores mamários e em carcinomas renais com a translocação t(6,11)(p21;q12).<sup>108;115</sup>

**Melan-A**, também denominado MART-1, acrónimo de *Melanoma Antigen Recognized by T-cells*, são proteínas citoplasmáticas de diferenciação melanossómica disponíveis em 2 clones de anticorpos: A103 e M2-7C10.<sup>116</sup> A única diferença de marcação consiste em que o primeiro clone, A103, marca também tumores do córtex suprarenal e alguns tumores esteróides das gónadas ao contrário do segundo, M2-7C10, que não os marca.<sup>117</sup> O Melan-A tem bastantes semelhanças de marcação com o HMB-45, marcando também PEComas e sarcomas de células claras.<sup>118;119</sup> A sensibilidade do Melan-A também é muito semelhante à do HMB-45, variando entre 75 e 92%, assim como a sua especificidade entre 95 e 100%.<sup>120</sup> Também à semelhança do HMB-45, a marcação com Melan-A é mais frequente e intensa nos MM primários do que nas metástases.<sup>111</sup> Um dos problemas com o Melan-A é a positividade de queratinócitos basais, em pele com dano actínico crónico, podendo simular MM.<sup>121</sup>

**Tirosinase** é uma enzima responsável pela hidroxilação da tirosina no primeiro passo da síntese de melanina.<sup>94</sup> A marcação é finamente granulosa no citoplasma dos melanócitos mas habitualmente intensa e difusa.<sup>112;122</sup> A sensibilidade da tirosinase nos MM varia entre 84 e 94% diminuindo progressivamente com o tempo de evolução do MM e suas metástases para valores entre 79 e 93%. No entanto, a sua especificidade é muito alta e varia entre 97 e 100%.<sup>123;124</sup> Raramente pode marcar angiomiolipomas, sarcomas de células claras dos tendões e tumores pigmentados da bainha dos nervos.<sup>125;126</sup>

**MITF** ou factor de transcrição da microftalmia é uma proteína necessária ao desenvolvimento e sobrevivência dos melanócitos, também importante na regulação da resposta pigmentar dos melanócitos. A expressão do MITF é determinada pela sua reactividade com o anticorpo D5, sendo a sua marcação considerada positiva apenas quando é nuclear, o que torna a sua interpretação mais fácil, principalmente nos casos em que existe pigmento de melanina no citoplasma dos melanócitos.<sup>94</sup> Estão publicadas sensibilidades para MM entre 81 e 100%, mas é interessante a sua positividade em casos raros de MM S100 negativos.<sup>127;128</sup> A sua especificidade varia entre 88 e 100%, podendo ser ainda mais baixa no caso dos MM de células fusiformes.<sup>129;130</sup> Estão descritos falsos positivos em alguns tumores não-melanocíticos de células fusiformes, linfomas e em carcinomas renais e mamários.<sup>123;127;130</sup> À semelhança de outros marcadores melanocíticos o MITF é positivo nos angiomiolipomas.<sup>125</sup> A sua pouca

## MELANOMA MALIGNO

especificidade é demonstrada pela marcação de células tão diversas como histiócitos, mastócitos, linfócitos, fibroblastos, células de Schwann e células musculares lisas.<sup>123;128;130</sup>

**C-KIT** é um proto-oncogene localizado no braço longo do cromossoma 4q11-12 que codifica a proteína do receptor de um factor de crescimento com actividade tirosina quinase, denominado KIT ou CD117. Esta é uma proteína de 145-160 kDa relacionada estruturalmente com o factor de crescimento das plaquetas<sup>131</sup> e expressa não só pelos melanócitos, como também, pelas células hematopoiéticas progenitoras (*stem-cells*), mastócitos, células basais da epiderme, células epiteliais da mama, células germinativas e células intersticiais de Cajal. C-KIT pode ser expresso em MM, principalmente do tipo de crescimento superficial. Não parece ter qualquer valor prognóstico, no entanto, quando positivo poderá indicar nesse doente a existência de uma segunda neoplasia, para além do MM.<sup>132;133</sup> Tem uma grande importância não só no diagnóstico dos tumores do estroma gastro-intestinal (GISTs<sup>134</sup>) como também no seu tratamento porque está já comercializado um inibidor tirosina quinase selectivo da proteína KIT, *imatinib* (Glivec®, denominado anteriormente como *STI571*, Novartis Pharma, AG, Basel, Suíça) que é usado como terapêutica neste tipo de tumores sólidos, assim como na leucemia mieloide crónica positiva para o Ag Philadelphia.<sup>135</sup> Em Dermatologia, o *imatinib* está indicado no tratamento de metástases de Dermatofibrosarcoma *protuberans*.<sup>136;137</sup>

O **P75-NGFR** (receptor do factor de crescimento neural) é uma proteína de 75 kDa que funciona como receptor de baixa afinidade para o factor de crescimento neural, foi estudado em MM por Kanik e col.<sup>138</sup> e revelou ser positivo em 10 de 13 MM de células fusiformes e só em 3 de 8 MM de células não-fusiformes. Também revelou marcação em todos os 5 nevus “neuróides” testados. Iwamoto e col.<sup>139</sup> descreveram positividade P75 em todos os 16 MM de células fusiformes estudados e apenas positividade em 6 de 10 MM de células não-fusiformes. Contudo Fanburg-Smith e col.<sup>140</sup> mostraram que o P75 marca também outros tumores malignos não-melanocíticos de células fusiformes, incluindo tumores malignos da bainha dos nervos periféricos, dermatofibrosarcoma *protuberans*, sarcomas sinoviais e rabdomiosarcomas.

NKI/C3 é uma glicoproteína de 25-110 kD localizada na membrana interna de vesículas citoplasmáticas de melanócitos. A sua marcação só deve ser considerada positiva quando marca a membrana celular dos melanócitos.<sup>95</sup> Estão publicadas sensibilidades que variam entre 86 e 100%. Muito popular nos anos 80, tem vindo progressivamente a ser abandonada no estudo de lesões melanocíticas pelo seu alto custo e sua baixa especificidade. Marca neurotequeomas celulares, carcinomas medulares da tiróide, tumores de células granulosas e tumores

neuroendócrinos e, mais raramente, alguns carcinomas de mama, da próstata, de células claras do pulmão, colorectal, da bexiga e dos ovários, além de linfomas, neurofibromas e schwannomas.<sup>114;141-143</sup> A nível celular pode marcar histiócitos, células dendríticas, mastócitos, células endoteliais, eosinófilos, e células de glândulas salivares, brônquicas, sudoríparas, pancreáticas e prostáticas.<sup>94</sup>

Existem novos marcadores de diferenciação melanocítica ainda em fase experimental e portanto ainda de uso restrito na prática clínica. Destacamos pelo seu interesse futuro MUM-1 ou *MUltiple Myeloma-1* proteína com um papel na regulação da expressão genética em resposta a citocinas, já utilizado no estudo de doenças linfoproliferativas;<sup>113</sup> Melanocortina-1 que é um receptor da hormona estimulante dos melanócitos-alfa,<sup>144</sup> SM5-1 que é um anticorpo monoclonal produzido por ratos imunizados com a linhagem SMMU de MM,<sup>145</sup> PLN2 que é um anticorpo ainda não totalmente caracterizado,<sup>146</sup> anticorpos recentes para tirosinase TRP-1 e TRP-2<sup>147</sup> e o WT1 ou *Wilms Tumor 1* que parece ser uniformemente negativo nos nevos melanocíticos comuns e marcar 35% dos nevos displásicos, 85% dos nevos de Spitz, 88% dos MM epitelíoides, 90% das metástases de MM e 100% dos MM de células fusiformes.<sup>148</sup>

### 3.6.2. Marcadores de progressão e sinalização tumoral

Estes marcadores de progressão e sinalização tumoral têm sido estudados com dois objectivos: separação diagnóstica entre nevo e MM e avaliação do prognóstico do MM. Quase todos são marcadores nucleares e permitem-nos uma leitura indirecta da actividade tumoral. Esta pode expressar-se pelo número e localização das mitoses, assim como de alterações genéticas ligadas ao ciclo da divisão celular, seja por estimulação da proliferação celular, seja por diminuição da apoptose (Quadro 4.).

## MELANOMA MALIGNO

**Quadro 4. Características de marcadores de progressão e sinalização tumoral<sup>88</sup>**

MARCADOR	CC	ATIVIDADE CELULAR	TUMOR
<b>Ki-67</b> (MIB-1)	N	Todas as células em fase proliferativa G1, S, G2 e M (negativo na fase G0).	Marcador prognóstico em alguns tumores.
<b>MPM-2</b>	N	Todas as células em mitose.	
<b>Ciclina-D1</b> (PRAD I, bcl-1)	N	Regulador de Ciclinas CDK durante a fase G1, fosforila e inativa a proteína de supressão tumoral Retinoblastoma.	Linfoma do manto. Cancro da mama. CEC da cabeça e pescoço, esófago, bexiga e pulmão. Carcinoma hepato-celular. Adenomas da paratiróide.
<b>CDK2</b> (P33)	N	Actividade restrita à fase G1→S. Forma um complexo com a Ciclina E (E/CDK2)	
<b>CDK4</b>	N, C	Quinase dependente de Ciclina forma um complexo multiproteico com a Ciclina D, PCNA, e WAF1/P21/Cip1 com papel importante no controle da proliferação celular na fase G1. A sua actividade catalítica é inibida pela P16.	
<b>RB</b> (P110RB)	N	Gene supressor tumoral que previne as células de entrarem na fase S sendo por isso positivo em todas as células normais. Inibe a progressão dos tumores melanocíticos.	Todos os nevos, com ou sem displasia, mostram expressão intensa, assim como alguns MM primários. Nos MM a sua perda de expressão correlaciona-se com o aumento do nível de Clark e com taxas de sobrevida mais curtas.
<b>P16</b> (MTS1, CDKN2, INK4A)	N e C	Ausente nas células normais (liga-se e inibe as quinases dependentes das Ciclinas CDK4 e CDK6). A presença de P16 é inversamente proporcional à expressão de Retinoblastoma e de Ciclina D.	Carcinomas da amígdala (de células pavimentosas basalóides, em pacientes jovens), de pequenas células do pulmão, do estroma gastro-intestinal e em pavimento-celulares do colo do útero (HPV16+).
<b>P19</b> (INK4D)	N	Tal como os P15, P16 e P18, P19 pertence ao grupo INK4, com funções supressoras. Eles são dependentes de uma proteína RB normal e exibem uma expressão máxima durante a fase-S.	Leucemia mielóide aguda (mas não nas células mielóides diferenciadas). Astrocitomas, oligodendrogliomas, glioblastomas e outros tumores neurais (mas é negativo no cérebro normal).
<b>P21</b> (Proteína WAF1)	N	Grupo dos inibidores CDK que inclui P21/WAF1/CIP1, P27kip1 e P57/kip2. A sua expressão aumentada inibe a fosforilação do Retinoblastoma causando paragem do ciclo celular. A sua produção é regulada por TP53 normal.	
<b>P27</b> (kip1)	N	Células proliferativas (inibidor de quinase dependente da Ciclina). Liga-se ao complexo Ciclina E/CDK2, mas não a CDK2 isolada. Regula a progressão da fase G1 para S. Relação inversa ao Ag Ki-67.	Diminuição de marcação associada com prognóstico desfavorável no mieloma múltiplo e em carcinomas do rim, cólon, mama, pulmão (de células não-pequenas), hepato-celular e colo do útero.
<b>PTEN</b> (Phosphatase and tensin homolog, MMAC1, TEP1)	N	Gene supressor tumoral que regula o ciclo celular, apoptose e adesão celular.	MM e carcinomas (mama, <sup>157</sup> endométrio, bexiga, próstata e de pequenas células do pulmão).
<b>BRAP*</b> ( <i>v-raf murine sarcoma viral homolog</i> )	-	Proteína da via MAPK que aumenta a proliferação dos melanócitos.	Nevos comuns e maioria de MM são positivos. Nevos de Spitz e nevos azuis celulares, assim como os MMD são negativos.

Ag, antigénio; C, citoplasma; CC, componente celular; CEC, carcinoma espinocelular; HPV, vírus papiloma humano; M, membrana celular; MAPK: *mitogen-activated protein kinase*; N, núcleo.

\*A pesquisa da mutação V600E é feita por PCR e não por IHQ.

**Ki-67**, ou MIB-1 é um marcador nuclear presente em todas as fases activas do ciclo de proliferação celular, mas ausente na fase quiescente G<sub>0</sub>.<sup>149</sup> Ki-67 foi gerado por imunização de ratos com núcleos da linhagem celular L428 de Linfoma de Hodgkin e o seu nome deriva da cidade alemã de Kiel e do número do clone celular original. Ki-67 é um excelente marcador para calcular a fracção de crescimento de uma população celular que mostrou ser positivo em menos de 5% das células nos nevos melanocíticos benignos, apesar de haver publicações que referem positividade até 15% das células nos nevos de Spitz e das células de nevos displásicos. Pelo contrário, Ki-67 mostrou ser positivo entre 13 e 30% das células de MM, apesar de haver registos individuais de quase 100% de positividade. Células em fase proliferativa observadas no limite inferior da lesão melanocítica, particularmente na derme reticular, constituem um achado muito sugestivo de MM.<sup>150</sup> Existem resultados contraditórios do interesse do Ki-67 como indicador prognóstico no MM. Alguns estudos mostraram uma correlação positiva independente entre a marcação por um lado e o potencial metastático e a mortalidade pelo outro, apenas constatada nos MM espessos,<sup>151;152</sup> enquanto outros autores apenas detectaram essa correlação nos MM finos.<sup>153</sup> Muitos estudos mostram uma correlação directa entre a positividade das células de MM para Ki-67 e a taxa de recidivas locais e a mortalidade, enquanto outros autores demonstraram que esta correlação não é independente da espessura dos MM.<sup>154-156</sup>

**MPM-2** (*Mitotic protein monoclonal 2*) é também um marcador de mitoses. A proteína cromossómica *major* reconhecida pelo anticorpo MPM-2 foi identificada como uma isomorfa alfa da topo-isomerase II do ADN (topo alfa-II) com um papel importante na fase G<sub>2</sub> tardia e nas fases precoces das mitoses. O seu interesse aumentou quando se descobriu que novos medicamentos anti-neoplásicos, como o etoposido, possuem actividade contra uma série de tumores sólidos usando como alvo a topo-isomerase alfa-II. Os MM primários expressam mais topo alfa-II quando comparados com nevos benignos (86% vs. 56%, p=0.0001).<sup>158</sup>

**Ciclinas** são proteínas com cerca de 100 aminoácidos, assim denominadas devido à natureza cíclica da sua produção e degradação. Contribuem para a progressão do ciclo celular pois ao ligarem-se às quinases dependentes de Ciclins (CDK) promovem a activação destas, formando complexos Ciclina-CDK. Ciclins D, E, A e B surgem sequencialmente em cada ciclo celular, ligadas a uma ou mais CDK. Complexos Ciclina D-CDK4, Ciclina D-CDK6 e Ciclina E-CDK2 regulam a transição G<sub>1</sub>→S por fosforilação da proteína retinoblastoma (pRB), Ciclina A-

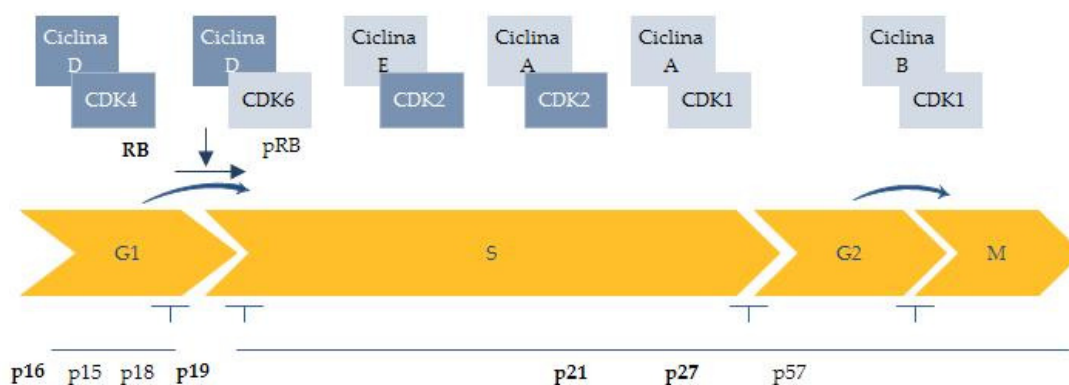
## MELANOMA MALIGNO

CDK2 e Ciclina A-CDK1 são activos na fase S e Ciclina B-CDK1 é essencial na transição G2→M (Quadro 5).

A marcação por Ciclina A é muito rara nos nevus benignos, mas marca entre 42 a 99% dos MM. Nos MM de crescimento superficial está descrita uma correlação inversa entre a sua marcação e o intervalo livre de doença.<sup>159</sup>

Ciclina B só muito raramente é expressa nos nevus benignos e marca cerca de 50% dos MM,<sup>160;161</sup> no entanto o seu valor prognóstico é desconhecido.

Quadro 5. Ciclinas, CDK e CDKi



**Ciclinas D1 e D3**, à semelhança das Ciclinas anteriores, só raramente marcam os nevus benignos mas marcam habitualmente os MM.<sup>161</sup> Enquanto a Ciclina D1 não parece ter qualquer interesse prognóstico, a marcação por Ciclina D3 parece estar associada com recidiva precoce e diminuição do tempo de sobrevida nos MMCS.<sup>162</sup>

Ciclina E parece estar inversamente relacionada com a sobrevida dos doentes com MM.<sup>161</sup>

**CDK2**, também denominada p33, é uma proteína da família da quinase serotonina/treonina localizada no cromossoma 12q13. É uma sub-unidade catalítica do complexo quinase dependente de Ciclina cuja actividade é restrita à fase G1→S. Está associada e é regulada pelas Ciclinas A e E e inibida pelas CDKi P21 e P27. A sua actividade promotora da divisão celular é também regulada por fosforilação.<sup>163;164</sup>

**CDK4**, quinase dependente da Ciclina forma complexos multiproteicos com a Ciclina D desempenhando um papel importante na proliferação celular na fase G1. Amplificação do gene

CDK4 pode ocorrer em MM, sarcomas e glioblastomas. Wang e col.<sup>165</sup> estudaram a expressão de CDK4 em 19 MM primários não-familiares observando uma intensa marcação nuclear e/ou citoplasmática em 11 dos 19 casos, em contraste com a ausência de marcação celular nos 28 nevos estudados, que incluíam 6 nevos de Spitz.

**Inibidores das quinases dependentes das Ciclinas (CDKi)** inibem o progresso do ciclo celular.<sup>166</sup> Estão separados em duas famílias: a das proteínas inibidoras INK4 (A-D) constituída por P16 (CDKN2A), P15 (CDKN2B), P18 (CDKN2C) e P19 (CDKN2D) que inibem os complexos Ciclina D-CDK4 e Ciclina D-CDK6; e a dos inibidores P21 (CDKN1A), P27 (CDKN1B) e P57 (CDKN1C) que podem inibir todas as CDK.

**P16** é um gene localizado no cromossoma 9p21 que inactiva o complexo CCND1/CDK4/6 constituído por Ciclina D, CDK4 e CDK6 actuando por inibição da fosforilação da proteína retinoblastoma que permite a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. P16 marca a maioria dos nevos, mas é negativa em 50 a 98% dos MM. No estudo de Wang e col.<sup>165</sup>, atrás referido, a propósito da CDK4, P16 foi expressa em 3 dos 19 MM (16%) e em 17 dos 28 nevos (61%), detectando-se num dos casos de MM uma marcação inversa CDK4 e P16 a nível celular. A perda de marcação P16 nos MM está associada com uma diminuição do tempo de sobrevivência, apesar de não ser considerada uma variável independente.<sup>161;167;168</sup> *CDKN2 locus* denominado “gene do MM familiar” pode ser detectado por FISH. Este gene é o responsável pela codificação de duas proteínas inibidoras do ciclo celular: P16 INK4A e P14ARF (*alternating reading frame*) sendo este último responsável pelo fabrico de uma nova proteína devido à leitura da informação de forma distinta. As duas proteínas actuam sobre diferentes alvos: P14ARF actua na via do P53 por inibição da MDM2 enquanto que P16 é um inibidor do complexo CCND1/CDK4/6 pelo que a diminuição de P16 ou o aumento da quantidade de Ciclinas estão associados ao aumento da proliferação celular tumoral.<sup>168-171</sup> Mutações na linha germinativa de CDKN2A estão associadas com 20 a 25% dos MM observados em irmãos.<sup>172;173</sup>

**P19** é codificado pelos exões beta 1 e exões 2 e 3 do gene P16 e liga-se ao MDM2 para regular a via do P53.<sup>174</sup>

**P21** inibe o complexo Ciclina/CDK e também se liga ao PCNA para inibir directamente uma delta polimerase envolvida na síntese de ADN. A presença de P21 é anómala e portanto só muito raramente marca nevos. A sua expressão é homogénea nos nevos de Spitz e intensa nos MM,<sup>175-177</sup> o que leva a pensar se o nevo de Spitz não será um MM com “senescência induzida por oncogene”.<sup>178</sup> Há resultados contraditórios sobre o valor prognóstico da marcação por P21.

## MELANOMA MALIGNO

Em células tumorais que perderam a proteína TP53 ou que contenham formas alteradas de TP53, os níveis de P21 encontram-se muito reduzidos ou totalmente ausentes.<sup>179</sup>

**P27** inibe principalmente os complexos Ciclina D/CDK4 e Ciclina E/CDK2, evitando a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. Há resultados contraditórios sobre a sua utilidade na separação entre nevos e MM.<sup>180;181</sup> Nos MM nodulares com menos de 5% de marcação P27 parece haver um aumento do risco de recidiva precoce, contudo não parece influir no tempo de sobrevida.<sup>182</sup>

**Retinoblastoma (RB)** foi o primeiro gene oncosupressor a ser descoberto e está localizado no cromossoma 13q14. Inicialmente descoberta nos retinoblastomas sabe-se hoje que a perda homozigótica deste gene é frequente em alguns tumores como o cancro da mama, carcinoma de pequenas células do pulmão e no carcinoma da bexiga. Codifica a proteína retinoblastoma que existe em todas as células sob duas formas: activa hipofosforilada e inactiva hiperfosforilada. Tem um papel importante na fase celular G1 ao permitir a paragem do ciclo celular para selecção do destino da célula: reentrada no ciclo com avanço irreversível para mitose, saída do ciclo celular de forma temporária (fase quiescente) ou definitiva (senescência) e diferenciação ou morte celular. A acção principal da proteína retinoblastoma é exercida pela inibição da Ciclina E, sendo por sua vez inibida pela sua fosforilação provocada pelos complexos Ciclina D-CDK4/6.<sup>183</sup>

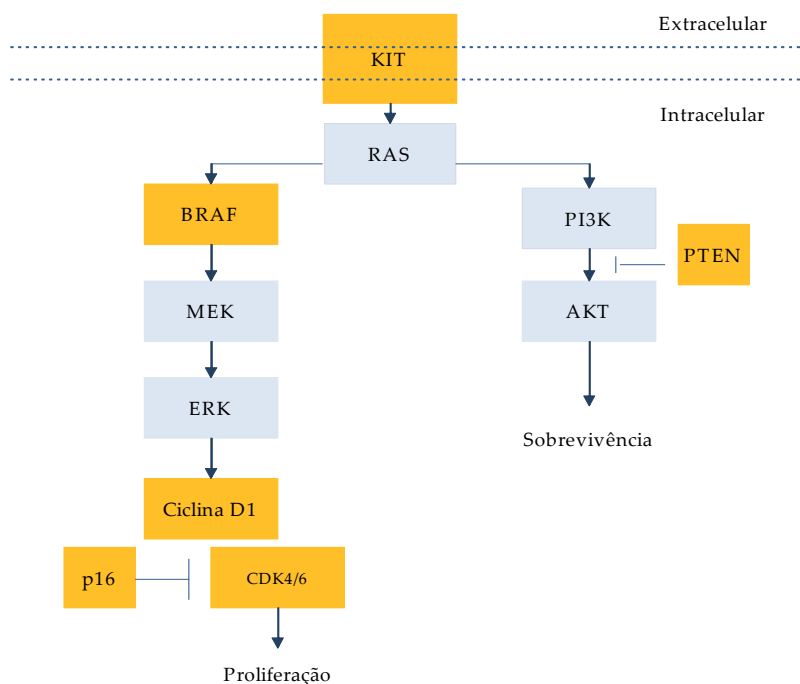
Um receptor tirosina quinase (KIT) é o início comum das duas vias de progressão e sobrevivência celular: MAPK (RAS→BRAF→MEK→ERK→CCND1/CDK4/6) e PI3K (RAS→PI3K→AKT) (Quadro 6).

O oncogene *AKT* é uma quinase serina-treonina que inibe a apoptose, através da via da quinase fosfatidilinositol-3 (PI3K). Este processo dá origem ao aumento do tempo de sobrevida celular mas não interfere com a divisão e multiplicação celular. Parece ser um factor independente de risco em MM finos.<sup>184;185</sup> Apenas se pode testar uma posição importante nesta via do PI3K que é o *PTEN*, gene oncosupressor que actua por inibição da transição PI3K→AKT.<sup>25</sup> Mutações na linha germinativa do PTEN foram encontradas na síndrome de Cowden que está associada com um aumento da predisposição para neoplasias da mama e da tiróide.<sup>186</sup>

Enquanto a via PI3K poderá ser considerada a via da sobrevivência, a via da MAPK poderá ser considerada a via da proliferação celular. MAPK pertence à família das quinases

denominadas quinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) que desempenham um papel importante na activação de células estacionadas nas fases G0 e G2 do ciclo celular.<sup>187</sup>

Quadro 6. Vias MAPK e PI3K<sup>6</sup>



AKT, non-specific serine/threonine protein kinase; BRAF, gene *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*; CDK, quinase dependente da Ciclina; ERK, *extracellular signal-regulated kinases*; KIT (CD117), *v-KIT Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*; MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; MEK, *mitogen-activated protein kinase-1*; PI3K, quinase 3 fosfatidilinositol; PTEN, *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*; RAS, *RAS viral oncogene homolog*.

**BRAF** é um gene que codifica a proteína BRAF que funciona como uma enzima serina-treonina quinase que activa a próxima proteína/enzima do ciclo MAPK pela adição de um radical fosfato. Este processo denomina-se sinalização a jusante (*downstream signalling*). Em 2002 foi descrita por Davies e col.<sup>188</sup>, na Nature, a presença de mutações do **BRAF** em 50-70% dos MM cutâneos, pesquisadas por PCR, sendo a mais frequente a substituição ocorrida no códon 600, de ácido glutâmico por valina (V600E) que ocorre em cerca de 90% dos casos.<sup>188</sup> Esta mutação está associada a um ganho de função do BRAF em cerca de 500 vezes,<sup>189</sup> com aumento da proliferação e sobrevivência dos melanócitos,<sup>190</sup> o que os torna quase “imortais”.<sup>191</sup> Experiências *in vitro* demonstraram que a mutação V600E/BRAF também estimula a invasão por células de MM e que é importante na neo-angiogénese *in vivo*.<sup>192</sup> A sua acção não necessita da função RAS

## MELANOMA MALIGNO

para o crescimento das linhagens celulares.<sup>188;193</sup> Curtin e col.<sup>6</sup> estudaram a relação entre a radiação ultra-violeta e as mutações BRAF e RAS afirmando ser possível separar subgrupos de MM com distintas exposições à radiação solar com uma certeza de 88% de acordo com o número de cópias de ADN. À semelhança dos nevos de Spitz e dos nevos azuis celulares a mutação BRAF não existe habitualmente nos MMD.<sup>194;195</sup>

TP53 é uma proteína oncosupressora com 53 kDa, que controla a paragem do ciclo celular nas fases G1 e G2, para permitir a reparação do ADN eventualmente lesado. Também induz a expressão de P21, ajudando a inibir a síntese de ADN. O gene que codifica a TP53 é o gene mais comumente mutado no cancro.<sup>196;197</sup> A TP53 normal (*wild-type*) tem uma semi-vida muito curta e portanto não é detectada por imuno-histoquímica, contudo a TP53 anormal tem uma semi-vida muito mais longa, podendo ser detectada por métodos imuno-histoquímicos.<sup>197;198</sup> TP53 não cora a maioria dos nevos comuns, é positiva em 9% dos nevos de Spitz e marca 25 a 58% dos MM.<sup>199</sup> A maioria das publicações não evidencia correlação entre a marcação por TP53 e a probabilidade de metástases, recidivas ou do tempo de sobrevida, e os poucos trabalhos que afirmam haver uma ligação entre a marcação TP53 e o prognóstico não a consideram um factor independente.<sup>198</sup>

Recentemente foram estudados como marcadores de proliferação celular o HDM2 que actua inibindo a TP53 por ubiquinação<sup>200;201</sup> e o GADD (*Growth arrest ADN damage*).<sup>202</sup>

PCNA ou *Proliferating Cell Nuclear Antigen* é uma proteína de 36 kDa que é um co-factor da polimerase delta do ADN e é expressa em todas as fases do ciclo de proliferação celular. Há uma expressão aumentada de PCNA nos MM quando comparada com nevos benignos,<sup>203</sup> apesar de se encontrar também aumentada a sua expressão nos nevos de Spitz.<sup>204</sup> A expressão aumentada de PCNA pode ser um factor prognóstico independente associado ao aumento da mortalidade e a uma diminuição do intervalo livre de doença,<sup>205</sup> apesar de outros autores não o confirmarem.<sup>206;207</sup>

Ezrin, uma proteína de 70 kDa, também envolvida na via da PI3K, parece ter uma marcação nos MM que é inversamente proporcional ao tempo de sobrevida.<sup>208</sup>

### 3.6.3. Marcadores de células do estroma

MM tem sido tradicionalmente conceptualizado como um fenómeno de multiplicação incontrolada de melanócitos tumorais autónomos originado por mutações de genes de proliferação e sobrevivência celular. Progressivamente esta ideia vai sendo complementada pela noção que estes tumores não são entidades isoladas mas que dependem e interagem com o micro-ambiente envolvente. Sendo assim, o MM é composto não só pelas células malignas tumorais como pelo estroma de suporte que inclui fibroblastos, células endoteliais, células imunes, moléculas solúveis e a matriz extra-celular. As células tumorais interagem com o micro-ambiente de forma bidireccional através de sinais moleculares que modulam o fenótipo maligno.<sup>209</sup> Para além da eventual informação prognóstica, uma cuidadosa avaliação das relações entre o tumor e o estroma poderá aumentar o nosso conhecimento sobre factores que regulam o crescimento tumoral e a disseminação metastática de neoplasias malignas em geral e do MM em particular.<sup>210</sup>

Com este objectivo podemos analisar as características de alguns marcadores utilizados no estudo imuno-histoquímico das células do estroma (Quadro 7).

**N-caderina** é uma proteína de 135 kDa pertencente à família das moléculas transmembrana que medeiam a adesão inter-celular dependente do cálcio. A função da N-caderina está dependente da sua associação com a actina do cito-esqueleto e é mediada por interações entre a região C-terminal da N-caderina e as proteínas citoplasmáticas cateninas. A estabilidade desta ligação é regulada pela fosforilação e desfosforilação das beta-cateninas. Desde 1996 que se conhece a marcação de lesões melanocíticas por caderinas, mais intensa nos melanócitos tipo A (epitelióides) da porção superficial dos nevos e com uma marcação mais difusa das células de MM.<sup>211</sup> E-caderina parece ter uma marcação mais intensa nos MM de crescimento superficial do que nos MM nodulares. Quando usada isoladamente não parece ter valor prognóstico, mas quando associada à marcação negativa com S100-A4, parece que a sua marcação prevê um maior intervalo livre de doença.<sup>212</sup>

**Fascina** é uma proteína de envolvimento da actina com 55 kDa codificada pelo gene hsn que parece estar envolvida na formação de feixes de microfilamentos. A sua presença foi detectada no citoplasma de células de Sternberg-Reed do Linfoma de Hodgkin, mas o seu maior interesse no estudo de estroma é porque também está presente nas células musculares lisas.<sup>213</sup>

## MELANOMA MALIGNO

**Quadro 7. Características de marcadores de células do estroma<sup>88</sup>**

MARCADOR	CC	CÉLULAS	TUMORES
<b>N-caderina</b>	M	N-caderina em tecidos normais: células nervosas, endoteliais, músculo-esqueléticas (em desenvolvimento), musculares cardíacas, mesoteliais da pleura e em sub-população de células hematopoiéticas progenitoras.	N-caderina (+) em mesoteliomas, astrocitomas, oligodendrocitomas, rabdmiossarcomas, cordomas, sarcomas sinoviais, MM, sarcomas epitelióides, angiosarcomas epitelióides e em sarcomas de células claras. Em associação com beta-catenina (-) representa uma mudança da forma celular epitelióide para a forma fusiforme.
<b>Fascina</b>	C, M	Células de Sternberg-Reed, células dendríticas e do retículo interdigitado dos gânglios linfáticos, histiócitos, músculo liso e miofibroblastos, endotélio, células descamativas das mucosas.	Linfoma de Hodgkin. Carcinoma da mama de alto grau. Tumor de células do retículo.
<b>CD13 (My7)</b>	M, C	Precusores de granulócitos e monócitos. Macrófagos, fibroblastos, osteoclastos e túbulos renais. Células endoteliais, do cérebro, do estroma da medula óssea, do bordo intestinal ( <i>brush</i> ) e do limite ( <i>lining</i> ) do ducto biliar.	LMA. LMC em crise blástica. Algumas LLA.
<b>AML-1A4</b>	C	Célula muscular lisa, célula mioepitelial, pericitos e miofibroblastos. Negativo na célula muscular estriada e cardíaca.	Tumores com diferenciação muscular lisa (músculo ou miofibroblastos).
<b>CD34 (HPCA1, QBEnd10)</b>	C, M	Célula progenitora hematopoiética (a marcação diminui com a maturação), células endoteliais, fibroblastos na pele, células intersticiais dendríticas, nervos, folículos pilosos, fibras musculares e glândulas sudoríparas.	Leucemias agudas, sarcomas vasculares, sarcoma de Kaposi, sarcoma epitelióide, DFSP, tumor fibroso solitário, neurofibromas, schwannoma, lipoma de células fusiformes.
<b>GLUT-1</b>	M	Eritrócitos, perinervo (incluindo fibroblastos), vasos sanguíneos e células do centro germinativo.	Carcinoma de células de transição, Carcinoma espinocelular, carcinoma do pulmão, adenocarcinomas, tumores de células germinativas.
<b>Claudina-1 (CLDN1)</b>	M (não C)	Células epiteliais, células perineurais incluindo fibroblastos, algumas células endoteliais (vénuas)	Perineurioma(+) vs. fibromatoses(-) sarcomas fibromixóides de baixo grau(-) e DFSP(-). Áreas epitelióides de sarcomas sinoviais.

(-), negativa; (+) positiva; C, citoplasma; CC, componente celular; DFSP, dermatofibrosarcoma *protuberans*; LLA, leucemia linfática aguda; LMA, leucemia mielóide aguda; LMC, leucemia mielóide crônica; M, membrana celular; N, núcleo.

**CD13**, antígeno também conhecido como aminopeptidase N, é uma ectopeptidase transmembrana de 150 kDa. O antígeno funciona como uma metaloprotease de ligação ao zinco que desempenha um papel na apresentação do antígeno da superfície celular de péptidos ligados a receptores HLA de classe II. Apesar do CD13 ter sido primeiro descrito como

marcador de células hematopoiéticas com origem mielóide e ser usado na classificação de leucemias pode ainda ser utilizado como marcador de estroma pois é expresso pelos fibroblastos. Demonstrou-se que a elevação da expressão de BFGF (*basic fibroblast growth factor*) se associa a um aumento da expressão de CD13 resultando num incremento da capacidade invasiva e do comportamento metastático das células do MM humano.<sup>214</sup> Conseguiu demonstrar-se *in vitro* que a invasão por células tumorais metastáticas humanas através de filtros com Matrigel pode ser inibida por um anticorpo M anti-CD13, WM15 e é dependente da concentração deste.<sup>215</sup>

**Actina ou alfa-actina do músculo liso (1A4)** é um componente major do citoesqueleto separada dos componentes beta e gama da actina devido a ter um ponto isoeléctrico diferente. O seu interesse no estudo do estroma reside na marcação de todas as células musculares lisas e de miofibroblastos.<sup>216</sup> Alguns MM podem exibir um fenotipo aberrante que inclui proteínas contrácteis alfa-actina do músculo liso e desmina.<sup>87</sup>

**CD34** é uma proteína transmembrana fortemente glicosilada de 110 kDa, com funções ainda não totalmente conhecidas. Poderá desempenhar um papel na adesão celular funcionando como um ligando para as lectinas. O seu gene está localizado no cromossoma 1q32.<sup>217</sup> Na pele o CD34 é invariavelmente positivo na marcação de fibroblastos atípicos no Dermatofibrosarcoma *protuberans*.<sup>218</sup> O antígeno CD34 é expresso por alguns tumores das bainhas nervosas, principalmente nas áreas Antoni B dos schwannomas. É habitualmente negativo nos tumores malignos das bainhas dos nervos e deve ser usado num painel contendo S100 e CD57.<sup>219</sup>

**GLUT-1** (*human erythrocyte glucose transporter*) é expresso em algumas neoplasias malignas e está relacionado com o aumento de captação da glicose pelas células tumorais. Baer e col.<sup>220</sup> estudaram a sua marcação num variado grupo de tumores descobrindo forte positividade em todos os casos de doença de Bowen (14/14), em 13 de 15 queratoses actínicas (87%), marcação em 8 casos de 15 cicatrizes (53%), mas a marcação foi sempre negativa em todas as verrugas seborreicas, basaliomas e MM testados.

**Claudinas** (do latim *claudere*, fechar) constituem uma família de mais de 20 proteínas que compõem a *tight junction*. Estão presentes em conjunto com outros componentes incluindo ocludina e molécula de adesão juncional e interagem com proteínas estruturais ZO-1, ZO-2 e ZO-3. A Claudina-1 é expressa pelos epitélios e pelas células perineurais sendo de grande utilidade no diagnóstico dos perineuriomas.<sup>221</sup>

## MELANOMA MALIGNO

Estes dois últimos marcadores GLUT-1 e Claudinas são habitualmente marcadores celulares usados no estudo da membrana celular.

### 3.6.4. Outros marcadores

Marcadores de receptores HLA de classe I e classe II mostraram um aumento de marcação nos MM quando comparada com a marcação em nevos e alguns estudos associam a diminuição da expressão destes marcadores em MM, com uma diminuição do tempo de sobrevida.<sup>222;223</sup> Paradoxalmente, em doentes com MM da coroideia que mostraram uma redução da marcação para HLA foi descrito um aumento da sobrevida.<sup>224</sup>

CD40 (um marcador de células B envolvidas na supressão tumoral)<sup>225</sup> e CD26 têm uma marcação mais intensa nos MM do que nos nevos, mas sem significado prognóstico.<sup>226</sup>

Antigénios do cancro testicular, quando usados em grupo, podem ter uma expressão aberrante em diversos tumores incluindo MM e serem úteis na distinção de lesões melanocíticas benignas e malignas.<sup>227</sup>

Terminamos fazendo uma referência sumária a outros marcadores pouco utilizados no estudo de lesões melanocíticas, seja devido ao seu custo, à sua inespecificidade ou por se encontrarem ainda em fase experimental:

- CD57 (Leu 7, HNK-1): tumores da bainha dos nervos, carcinomas neuroendócrinos, neurofibroma.
- CD63 (NKI/C3): melanócitos, mastócitos.
- CD146 (MELCAM, *melanoma cell adherin molecule*): melanoma, células de Schwann.
- EMA (*epithelial membrane antigen*): células epiteliais, sebócitos, células perineurais e plasmocitárias.
- GFAP (*glial fibrillary acidic protein*): diferenciação neural (30% dos tumores malignos das bainhas dos nervos periféricos são positivos), 53% dos MMD e células mioepiteliais.
- NEU N (*neuronal nuclei*).
- Neurofilamentos: axónios.
- NSE (*neuron specific enolase*): tumores neuroectodérmicos e neuroendócrinos.
- RET (*rearranged during transfection*): proto-oncogene nos neurónios e rim embrionário.
- Synaptophysin: tumores neuroectodérmicos e neuroendócrinos, neurónios.
- Synuclein-I: cérebro (corpo da dementia de Lewi e doença de Parkinson).

- Tau: corpos celulares do neurónio, neuropil e células gliais (+++ na doença de Alzheimer).
- ALK Protein (*Lymphoma-associated tumor antigen*): sistema nervoso, linfoma anaplásico de grandes células CD30+ e tumor miofibroblástico inflamatório.
- Bcl-2: proteína envolvida na inibição da apoptose.
- Bcl-6: proto-oncogene – *Kruppel-type zinc finger protein* são factores de transcrição.
- MPB (*Myelin Basic Protein*): tumores das bainhas dos nervos.
- L1 (Transduction Lab, San Diego CA): 90% dos MMD, neurónios, células de Schwann e tumores de origem neuroectodérmica.

### 3.6.5. Painéis de marcadores

Como nenhum marcador usado individualmente permite o diagnóstico de MM é habitual recorrer-se à utilização de conjuntos de marcadores.

A combinação de MITF e Melan-A revela 95% de sensibilidade e 100% de especificidade no diagnóstico de MM metastático epitelióide.<sup>228</sup>

O uso de um painel MRP (proteínas relacionadas com a melanogénese) constituído por Melan-A e tirosinase consegue identificar a presença de células de MM em infiltrado inflamatório, de ninhos de MM em cicatriz e de invasão precoce da derme e margens positivas em MM *in situ* do tipo lântigo maligno.<sup>229</sup>

No caso particular de MM de células fusiformes, nomeadamente desmoplásico, que é tipicamente negativo para o painel MRP, o uso de técnicas de recuperação de antígeno com recurso a microondas, permite desmascarar a presença de tirosinase e de HMB-45.<sup>126</sup>

A associação de P75-NGFR (*nerve growth factor receptor*) neste tipo de MM com células fusiformes ajuda na identificação de células tumorais na margem de excisão cirúrgica, mesmo quando presentes em número escasso.<sup>138;230</sup>

Estudos auxiliares que aumentam a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico histológico de MM incluem a análise da fracção do crescimento tumoral através da marcação com o Ki-67,<sup>149;231</sup> registo das alterações no número de cópias de ADN por hibridização genómica comparativa ou identificação da expressão dos genes de assinatura de MM pelos perfis de variação da expressão genética.<sup>21;161;232</sup>

## MELANOMA MALIGNO

### 3.7. Factores de prognóstico

Informação recolhida pelo *American Joint Commission on Cancer Staging Committee* (AJCC) concluiu em 2001, que os MM finos (de espessura igual ou inferior a 1 mm) têm um excelente prognóstico com uma sobrevida superior a 90% aos 5 anos, em contraste com os MM espessos (de espessura superior a 4 mm) que estão associados a um pior prognóstico, com cerca de 45% de sobrevida aos 5 anos.<sup>233;234</sup> Além da espessura, outros factores são relevantes para o estabelecimento do prognóstico. Foi assim proposta a separação dos doentes, com MM, em subgrupos de prognóstico semelhante, com interesse no tratamento e na investigação. O sistema de classificação clínico-patológica da AJCC, em cinco estádios (0 a IV), considera os aspectos do tumor primário (T), a presença e o número das metástases ganglionares (N) e a presença e a localização das metástases à distância (M), para determinar o estágio baseado nestes três atributos (TNM). O doseamento sérico da enzima desidrogenase láctica ou LDH, pode ter igualmente interesse prognóstico.<sup>235</sup> (Quadro 8.).

**Quadro 8. Classificação TNM de melanomas malignos cutâneos<sup>65;233</sup>**

CLASSIFICAÇÃO T	ESPESSURA (MM)	ULCERAÇÃO
T1 a/b	≤1.0	T1a: sem ulceração e nível de Clark II/III T1b: com ulceração e/ou nível IV/V
T2 a/b	1.01-2.0	a: sem ulceração
T3 a/b	2.01-4.0	b: com ulceração
T4 a/b	>4	
Classificação N	Nº de gânglios metastáticos	Características das metástases
N1 a/b	1	a: micrometástases ganglionares (após linfadenectomia sentinela ou electiva)
N2 a/b/c	2-3	b: macrometástases ganglionares (detectáveis clinicamente)
N3	4 ou mais	c: metástases satélites ou em trânsito
Classificação M	Localização	LDH no sangue
M1a	Pele (à distância), subcutâneas ou ganglionares	Normal
M1b	Pulmão	Normal
M1c	Todas as outras viscerais Quaisquer à distância	Normal Elevada

T, tumor primário; LDH, desidrogenase láctica; M, metástases viscerais; N, metástases ganglionares.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

Apesar de existirem variáveis clínicas com interesse prognóstico, o estudo histológico do MM é fundamental, pois fornece-nos o factor prognóstico mais importante quando usado isoladamente – nível de Breslow, referido adiante – que corresponde à espessura do MM em mm.

A associação das informações clínicas e histopatológicas permite a separação dos doentes em estádios, entre 0 e IV, com prognósticos distintos (Quadro 9).

A sobrevida aos 5 anos para os casos de MM primário diagnosticado nos estádios entre 0 e II é de cerca de 80% se comparada com uma sobrevida de 35% quando os gânglios linfáticos estão invadidos (estádio III). Quando existem metástases à distância (estádio IV) a sobrevida aos 5 anos é na ordem dos 10%.<sup>234</sup>

Contudo existem excepções, tanto de doentes com MM finos que faleceram de metástases,<sup>236;237</sup> como de doentes com MM espessos que nunca tiveram recidiva do seu MM.<sup>15</sup> Numa tentativa de melhor prever a sobrevida nos estádios I e II de MM foram estudados numerosos factores prognósticos isoladamente e em modelos multifactoriais de pequenas e grandes amostras.

**Quadro 9. Grupos de estadiamento do melanoma maligno cutâneo<sup>65;233;238</sup>**

ESTÁDIO	CLÍNICO			PATOLÓGICO		
	T	N	M	T	N	M
0	Tis*	N0	M0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	T1a	N0	M0
IB	T1b-T2a	N0	M0	T1b-T2a	N0	M0
IIA	T2b-T3a	N0	M0	T2b-T3a	N0	M0
IIB	T3b-T4a	N0	M0	T3b-T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	T4b	N0	M0
III	T1-T4	N1-N3	M0			
IIIA				T1-T4a	N1a-N2a	M0
IIIB				T1-T4b	N1a-N2c	M0
IIIC				T1-T4	N1b-N3	M0
IV	T1-T4	N1-N3	M1	T1-T4	N1-N3	M1

Tis = Tumor *in situ*

## MELANOMA MALIGNO

Clinicamente podemos afirmar que são variáveis de pior prognóstico:

- **Idade** – MM com a mesma espessura tem habitualmente um comportamento mais agressivo nos doentes com mais de 60 anos.<sup>239;240</sup>
- **Localização anatómica** – A ocorrência de MM em localização acral (palmas, plantas ou área subungueal) pensava-se ser um indicador de pior prognóstico.<sup>241</sup> A localização de MM na área BANS – acrónimo inglês para dorso (*back*), braço (*arm*), pescoço (*neck*) e couro cabeludo (*scalp*) – foi há uns anos associada com pior prognóstico nos MM primários de espessuras entre 0,76 mm e 1,69 mm, mas sabe-se hoje que não tem significado prognóstico.<sup>242-244</sup> MM da cabeça e pescoço e do tronco estão associados com uma maior taxa de metástases e de mortalidade do que o MM acral<sup>234</sup> e que quando ocorrem na cabeça, o couro cabeludo é a localização associada com o pior prognóstico.<sup>245</sup>
- **Sexo** – Habitualmente os MM com a mesma espessura têm um comportamento mais agressivo nos homens do que nas doentes do sexo feminino.<sup>239</sup> O significado estatístico do sexo tem como variável de confundimento a localização anatómica, pois é sabido que o MM no sexo feminino ocorre predominantemente nas extremidades inferiores e esta localização parece estar associada a uma maior taxa de sobrevida.<sup>246</sup>
- **Ulceração** – Habitualmente associada a um volume tumoral maior e portanto a um pior prognóstico.<sup>247</sup>

O estudo histológico da totalidade da peça excisada permite-nos estudar as variáveis histológicas com interesse prognóstico:

- **Nível de Breslow** corresponde à espessura do MM em mm medida na vertical entre o topo da camada granulosa e a célula tumoral localizada mais profundamente.<sup>248</sup> Só é utilizado nos MM com fase de crescimento vertical. Nas lesões ulceradas usa-se como limite superior da medição a base da ulceração. Quando o MM tem uma espessura inferior a 0,76 mm é denominado MM fino e só muito raramente metastiza.<sup>249</sup> Isoladamente é a característica mais importante na previsão do tempo de sobrevida de doentes com MM de estágio I.<sup>234</sup>
- **Nível de Clark** corresponde ao grau de invasão tumoral e divide-se em 5 níveis sendo o nível I quando a lesão se encontra confinada à epiderme e seus anexos (MM *in situ*) até ao

nível V que corresponde à invasão tumoral do panículo adiposo.<sup>241</sup> No Quadro 10 mostra-se a relação entre o nível de Clark e a taxa de sobrevida aos 10 anos.

**Quadro 10. Percentagem de sobrevida livre de doença aos 10 anos<sup>238</sup>**

---

–	Nível I (intraepitelial ou <i>in situ</i> ): 100%
–	Nível II (derme papilar): 96%
–	Nível III (derme papilar/derme reticular): 86%
–	Nível IV (derme reticular): 66%
–	Nível V: (hipoderme): 53%

---

- **Ulceração** define-se como uma solução de continuidade no epitélio que recobre o tumor, com evidência de reacção do hospedeiro, para se poder excluir a que resulta do traumatismo da biópsia. Está demonstrado que a ulceração agrava o prognóstico em inúmeras análises multivariáveis já publicadas.<sup>250-252</sup>
- **Regressão** corresponde à “destruição” de partes do MM por linfócitos memória, que se pensa terem metastizado primariamente para um gânglio regional e que “regressaram” ao tumor. Faz-nos também pensar que o tumor já teria tido uma espessura maior, numa fase prévia ao recrutamento das células inflamatórias.<sup>234,253,254</sup>
- **Índice mitótico** expressa-se em baixo, médio e alto, de acordo com o número de mitoses contadas em 10 campos microscópicos, com a objectiva de grande ampliação (400x), quando são inferiores a 1, entre 1 e 4 e mais de 4 mitoses, respectivamente. A presença de mitoses na derme está associada a uma diminuição da sobrevida.<sup>255</sup> Quando o número de mitoses é igual ou superior a 6, o risco de metastização é 12 vezes superior ao de um doente em cujo tumor não se observa qualquer mitose.<sup>239</sup>
- **TIL** ou *tumor infiltrating lymphocytes* corresponde à presença de linfócitos infiltrando o tumor (entre ou em contiguidade com as células tumorais) e mostrou ter um significado prognóstico independente.<sup>256</sup> O prognóstico é melhor quando existe uma reacção inflamatória intensa, definida como uma banda linfocitária densa, por baixo do tumor ou infiltrando difusamente o próprio tumor. Inversamente, a ausência de infiltrado inflamatório está associada a um pior prognóstico. O volume do infiltrado linfocitário é inversamente proporcional à espessura do MM primário, sendo habitualmente escasso nos tumores que são invasivos em profundidade.<sup>257,258</sup>

## MELANOMA MALIGNO

- **Invasão linfo-vascular** corresponde à presença de células tumorais não só dentro dos vasos linfáticos ou sanguíneos, como também na sua parede (junto às células endoteliais) e está associada a um pior prognóstico.<sup>259</sup> A invasão vascular pode estar também associada à ocorrência de metástases em trânsito.<sup>260</sup>
- **Neurotropismo** corresponde à observação microscópica de células tumorais malignas no espaço perineural dos nervos.<sup>261</sup> O neurotropismo pode ser intraneural, perineural ou ter aspectos de diferenciação neural, simulando células de Schwann.<sup>262</sup> A extensão do MM ao longo de nervos cranianos periféricos pode ser uma complicação de alguns MM da cabeça e pescoço, principalmente da variedade desmoplásica.<sup>263</sup> Denominam-se então MM neurotrópicos e podem estar associados com infiltração local, recidivas múltiplas e metástases para o SNC.<sup>264</sup>
- **Satelitose** corresponde à presença de focos tumorais, isolados do tumor principal, localizados a menos de 5 cm da lesão primária. Quando os focos tumorais surgem na mesma região anatómica, mas a uma distância superior a 5 cm denominam-se metástases em trânsito. A presença de satelitose é um indicador de mau prognóstico, pois corresponde ao estágio IV do sistema de classificação da AJCC, mesmo quando as metástases são apenas microscópicas.<sup>233;265;266</sup>

O estudo por imuno-histoquímica pode revelar alguns marcadores com interesse prognóstico conforme podemos observar no Quadro 11 adaptado da classificação de tumores cutâneos da OMS.<sup>64</sup>

**Quadro 11. Marcadores imuno-histoquímicos com interesse prognóstico**

MARCADOR	EXPRESSÃO	PROGNÓSTICO
Ki-67	↑	-
P16	↓	-
MPM-2	↑	-
Gp100	↓	-
MITF	↑	+

↑, aumentada; ↓, diminuída; -, desfavorável; +, favorável.

Marcadores de proliferação tumoral usados para distinção entre nevos e MM e que poderão ter eventualmente qualquer interesse prognóstico são:

- **Ki-67** que marca menos de 5% dos nevos e entre 13-30% dos MM (% intermédia no nevo de Spitz) sendo considerado um factor prognóstico de risco independente mas com resultados díspares.
- **Ciclina D1** em que os nevos são raramente positivos enquanto os MM são frequentemente marcados, mas sem significado prognóstico.
- **P16** que se exprime na totalidade dos nevos, mas com perda de marcação em 50 a 98% dos MM (a perda de marcação está associada com menor sobrevida, mas não é uma variável independente).
- **P21** que marca alguns nevos e é positivo numa percentagem maior de nevos de Spitz e MM, mas cujos resultados são contraditórios quanto à marcação positiva estar associada com alterações prognósticas.
- **P27** com interesse apenas nos MM nodulares em que uma marcação positiva inferior ou igual a 5% está associada a um risco de recaída precoce.<sup>101</sup>

## Melanoma Maligno Desmoplásico

### 4.1. Conceito

A primeira descrição de doentes com Melanoma Maligno Desmoplásico (MMD) foi efectuada em 1971, por Conley, Lattes e Orr<sup>267</sup> que publicaram na revista *Cancer*, sete casos de uma nova variedade de MM, ocorridos em 5 homens e 2 em mulheres. A especificidade histopatológica desta variedade de MM era fornecida pela presença na derme de melanócitos fusiformes amelanóticos dispersos entre grossas fibras de colagénio, que por vezes se associavam a proliferação melanocítica atípica juncional. Clinicamente seis deles estavam localizados na cabeça e no pescoço de doentes com mais de 40 anos de idade, enquanto que a excepção foi um rapaz de 13 anos, cujo tumor se localizava no pé. Clínica e histologicamente assemelhavam-se a proliferações fibrosas invasivas localmente, tipo cicatriz, com recidiva local, por vezes múltiplas, com intervalos entre 6 meses e 2 anos após a primeira excisão cirúrgica. O diagnóstico correcto só foi feito por vezes *a posteriori* nos gânglios linfáticos invadidos secundariamente, que revelaram aspectos histopatológicos de metástases de MM clássico ou de MM de células fusiformes (num dos doentes coexistiram os dois tipos de metástases ganglionares). A evolução para a morte ocorreu após disseminação metastática.

Em 1979, Reed e Leonard<sup>268</sup> descreveram no *American Journal of Surgical Pathology* um subgrupo de MM em que observaram crescimento tumoral dentro da bainha perineural, com invasão endo – e/ou perineural (neurotropismo) e com padrão de crescimento fascicular tipo nervo (diferenciação neural), em 22 MMD localizados em pele exposta de caucasianos de pele clara tendo-os designado MM neurotrópicos. Para estes autores o neurotropismo foi interpretado como fazendo parte integrante desta variedade de MM e não como um componente de tumor nervoso, tipo Schwannoma maligno. Notaram também, que estes tumores se associavam algumas vezes a aspectos histológicos de lénigo maligno, na epiderme supra-tumoral. Como nem todos os MMD são neurotrópicos, assim como, também existem MM

neurotrópicos que não são desmoplásicos, os termos “desmoplásico” e “neurotrópico” não podem ser usados como sinónimos, visto corresponderem a formas distintas de MM.<sup>269</sup>

Progressivamente foram sendo publicados casos isolados de MM com as características de desmoplasia atrás referidas, quase sempre em revistas de Oftalmologia, pelas suas localizações oculares: pálpebra superior,<sup>270</sup> assemelhando-se a chalazion,<sup>271</sup> ou com envolvimento orbitário,<sup>272;273</sup> e também em revistas de Otorrinolaringologia e de Cirurgia Plástica, com localizações descritas no pavilhão auricular,<sup>274</sup> parótida<sup>275</sup> e nádega.<sup>276</sup>

Estão também descritos casos observados nas mucosas oral<sup>277</sup> e labial.<sup>278</sup>

Encontra-se também referido um caso de MMD primário em localização visceral (pulmão), cujo doente teve posteriormente edema e parestesias da face, secundárias ao envolvimento do ramo maxilar do nervo trigémio.<sup>279</sup>

Das séries com grande número de doentes destacamos a maior, com 280 casos de MMD, publicada na *Cancer* em 1998 por Quinn e col.<sup>280</sup> da Unidade de MM de Sidney, a de Posther e col.<sup>281</sup> com 129 casos publicada nos *Annals of Surgical Oncology* em 2006 e a de Skelton e col.<sup>282</sup> com 128 doentes publicada no *Journal of the American Academy of Dermatology* em 1995.

Pelo seu interesse didáctico devemos também salientar os artigos de revisão publicados por Rütten e col.<sup>283</sup> (que engloba os primeiros 34 doentes da nossa série) e por Carlson e col.<sup>284</sup> que analisam um grande conjunto de variáveis clínicas e histopatológicas.

Merece ainda referência a revisão bibliográfica efectuada por Lens e col.<sup>285</sup>, que agrupou todas as séries publicadas até 2005, que contivessem 10 ou mais doentes com MMD e que foi publicada no *British Journal of Dermatology* desse ano.

Desde a descrição inicial de MMD foram publicados cerca de 1100 casos em todo o mundo o que representa menos de 1% de todos os MM cutâneos descritos. Da literatura pode inferir-se que o seu comportamento clínico será diferente do comportamento associado aos MM não-desmoplásicos, com a correspondente alteração de estratégia terapêutica. Alguns sugeriram que o MMD é melhor classificado como sarcoma dos tecidos moles devido ao seu crescimento relativamente lento, tendência para recidiva local e só raramente disseminar por via linfática. Esta última característica provocou o debate acerca do interesse do uso em doentes com MMD de radioterapia como terapêutica adjuvante<sup>286</sup> e do interesse do estadiamento ganglionar, especificamente a realização de biópsia do gânglio sentinela.<sup>287-290</sup>

### 4.2. Critérios de diagnóstico

MMD é uma entidade clínico-patológica, na qual a expressão histopatológica permite confirmar o diagnóstico e evidencia características imuno-histoquímicas particulares.

#### 4.2.1. Critérios clínicos de diagnóstico

MMD aparece como uma pápula, nódulo ou placa, da cor da pele ou eritematosa. Habitualmente é uma lesão infiltrativa, de consistência dura, não pigmentada e com aspecto cicatricial, localizada em áreas de pele com importante dano actínico, pelo que é muitas vezes interpretada como lesão não melanocítica, incluindo carcinoma espinocelular e tumor fibro-histiocitário.

MMD está associado em cerca de 1/3 dos casos, a alterações intra-epiteliais de lêntigo maligno (MM *in situ*).<sup>291</sup>

MMD localiza-se preferencialmente nas áreas expostas ao Sol da face e pescoço e por ordem decrescente de frequência no tronco e nas extremidades. Existem também publicações isoladas que referem a existência de MMD nas superfícies mucosas<sup>292</sup> e subungueais.<sup>293;294</sup>

MMD afecta habitualmente indivíduos na sexta e sétima décadas de vida, com idade média de apresentação de 62.6 anos. Como casos excepcionais referimos a ocorrência de MMD numa criança de 4 anos de idade na série publicada por Skelton e col.<sup>282</sup> e recordamos o rapaz de 13 anos de idade da série inicial de Conley e col.<sup>267</sup>

Sempre que ocorra recidiva de tumor localizado em cicatriz da face, região palmar ou plantar e em mucosas, o diagnóstico de MM desmoplásico deve ser colocado. Este diagnóstico é mais provável no caso da histologia prévia ter sido de nevo de junção (raro em doentes idosos) ou de lêntigo, principalmente na face.

#### 4.2.2. Critérios histológicos de diagnóstico

MMD tem um componente celular fusiforme predominante que se assemelha, em pequena ampliação, a lesão fibroblástica (cicatriz hipertrófica ou dermatofibroma), neural (neurofibroma e tumor maligno das bainhas nervosas de nervo periférico) ou outros sarcomas.

As células tumorais dispõem-se entre fascículos de grossas fibras de colagénio formando um tumor não capsulado que ocupa toda a espessura da derme.

As características histológicas do MMD são as seguintes:

- Colagénio abundante, de início fibrilhar, formando uma delicada rede eosinofílica contendo, ou não, mucina. Com o tempo as fibras de colagénio vão-se tornando progressivamente mais espessas e numerosas ficando a lesão cada vez menos celular. As lesões mais antigas ou que correspondem a recidivas parecem-se muito com cicatrizes hipertróficas, quelóides ou até mesmo com tumor desmóide ou fibrosarcoma.<sup>295</sup>
- Componente melanocítico juncional discreto presente em cerca de metade dos casos de MMD, que pode variar desde lântigo sobre MM até nevo de junção, por vezes displásico, mas é de grande ajuda na interpretação da lesão no seu todo. Nos outros 50% dos casos de MMD, este componente intraepitelial encontra-se ausente (regressão?) o que dificulta o seu diagnóstico.
- Elastose solar localizada na derme, não só na parte superficial do tumor, como também no seu interior e em profundidade.
- Presença de grande massa “fibrosa” não capsulada ocupando toda a espessura da derme e, por vezes, invadindo a hipoderme através dos septos do pânículo adiposo, sendo portanto classificado em nível IV ou V de Clark, no momento do seu diagnóstico.
- Neurotropismo e diferenciação neural (com presença de mastócitos e mucina) são frequentes.<sup>264;268;284;296-298</sup>
- Só muito ocasionalmente se observa invasão vascular.
- Predominância de melanócitos fusiformes semelhantes a fibroblastos, com um núcleo comprido e ligeiramente aumentado de tamanho.<sup>299</sup> Os núcleos são na maioria dos casos vesiculosos, com nucléolos proeminentes. É raro observar-se hiper cromasia e pleomorfismo nuclear, assim como mitoses atípicas. Na membrana nuclear é frequente

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

observarmos dobras e ranhuras. Habitualmente não se observa presença de pigmento de melanina nos melanócitos, pelo que a maioria destes são amelanóticos.

- Agregados linfóides localizados habitualmente na transição dermo-hipodérmica, junto aos limites laterais do tumor ou mesmo junto a trajectos nervosos, são uma das imagens de marca desta variedade de MM. Sempre que observamos folículos linfóides em lesão histológica semelhante a cicatriz, devemos colocar esta hipótese diagnóstica.
- Existência de faixa de Grenz que corresponde à ausência de tumor numa banda horizontal de espessura variável, localizada na derme superficial, imediatamente por baixo da junção dermo-epidérmica.
- Metaplasia óssea ou cartilaginosa é raríssima.<sup>300-302</sup>
- Áreas de MM convencional sob a forma de melanócitos epitelióides e até mesmo linfóides, presentes focalmente não só em MMD (mais celulares), como principalmente nas metástases. Nestas, por vezes só existem aspectos de MM convencional, o que permite perceber o conceito unitário de MM, abarcando a variedade desmoplásica. O inverso também é verdadeiro, pois estão descritas metástases desmoplásicas de MM cutâneos primários convencionais.<sup>267</sup>
- A via mais frequente de metastização do MMD é por infiltração local dos tecidos vizinhos e ao longo dos nervos. Segue-se por ordem de frequência a metastização à distância por via sanguínea. É rara a infiltração por via linfática das cadeias ganglionares regionais. O padrão histológico das metástases pode ser o de um MM convencional ou manter-se com estroma desmoplásico. As metástases são geralmente totalmente acrómicas.<sup>280;303;304</sup>

### 4.2.3. Critérios imuno-histoquímicos de diagnóstico

Busam e col.<sup>305</sup> demonstraram que é possível separar as formas desmoplásicas das outras formas de MM, com recurso ao estudo dos perfis de expressão genética. A expressão de genes de diferenciação melanocítica está muito diminuída no MMD, enquanto que se encontra aumentada a expressão de factores neurotróficos e de genes envolvidos na expressão da produção de matriz extracelular, nomeadamente clusterina, confirmada também por estudos imuno-histoquímicos.

Assim como para o estudo dos MM em geral, podemos utilizar três grupos de marcadores imuno-histoquímicos para o estudo de MMD: de diferenciação melanocítica, de progressão e sinalização tumoral e de células do estroma.

Os melanócitos fusiformes do MMD colocam uma dificuldade diagnóstica acrescida pois tal como este padrão morfológico das células não é o habitualmente observado nas outras variedades de MM, também os marcadores de diferenciação melanocítica são muitas vezes negativos, com excepção da proteína **S100** que é quase sempre positiva. Este marcador não só é importante para o diagnóstico final de MM, como também para o diagnóstico diferencial com outros tumores não melanocíticos, de células fusiformes, e serve também para a identificação dos limites do tumor, sendo portanto uma ferramenta essencial no estudo das margens de segurança cirúrgicas e no cálculo do índice de Breslow. Não se pode excluir mecanicamente o diagnóstico de MMD apenas pela negatividade da coloração por S100, segundo Kaneishi e col.<sup>102</sup> Também nos devemos lembrar que as células dendríticas de Langherans, as células de Schwann e os adipócitos são positivas para proteína S100.

**HMB-45** apenas marca o componente de células epitelióides que se observa por vezes na epiderme, ou nos MMD mistos ou combinados, o seu componente de células não fusiformes. Melanócitos fusiformes são habitualmente negativos, porque este tipo de célula não é pigmentada e portanto não costuma conter melanossomas. Este achado foi comprovado por estudos de microscopia electrónica, assim como pela coloração para pigmento melânico, Fontana-Masson, que também é negativa neste tipo de melanócitos.

**Melan-A** tem uma marcação quase sobreponível ao HMB-45, sendo portanto muitas vezes negativo, à excepção do componente de células não fusiformes. Quando é positivo observa-se apenas no componente juncional e no componente dérmico mais superficial.

**Tirosinase** comporta-se nos MMD de maneira semelhante aos marcadores HMB-45 e Melan-A só sendo positiva focalmente no componente melanocítico intraepitelial *in situ* e no componente nevíde superficial dos MMD.<sup>91;130;306</sup>

**MITF** é uma proteína codificada pelo gene da microftalmia cuja marcação é considerada positiva apenas quando é nuclear. Foram publicados valores muito díspares de sensibilidade de marcação em MMD como 7%,<sup>307</sup> 29%,<sup>308</sup> e até 55%.<sup>309</sup> Infelizmente este marcador não é 100% específico,<sup>129</sup> estando descritos casos de marcação em neurofibromas e em fibroxantomas atípicos.<sup>310</sup>

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

**C-KIT** é um receptor transmembrana de um factor de crescimento com actividade tirosina quinase crucial para o desenvolvimento e proliferação dos melanócitos. A sua expressão é máxima nas fases iniciais do MM, diminui progressivamente com o crescimento tumoral local e parece haver uma correlação inversa da marcação com o avanço do MM para a fase metastática.<sup>311</sup> A mutação de C-KIT em modelos murinos pode resultar em transformação maligna de melanócitos com produção de tumores semelhantes ao MM amelanótico.<sup>312</sup> Em 2003 Potti e col.<sup>133</sup> testaram por imunohistoquímica 202 MM tendo registado uma marcação positiva para C-KIT em 46 (22,8%) dos casos, que correspondiam por ordem decrescente de frequência aos seguintes tipos histológicos: MM de crescimento superficial (53,7%), lântigo maligno (23,3%), MM acrolentiginoso (13,0%) e MM amelanótico (4,8%). O estudo da sequência dos pontos de mutação do KIT não pode ser realizado por imuno-histoquímica, sendo necessário efectuar pesquisa de mutações por PCR.

**P75-NGFR**, um receptor de baixa afinidade para o factor de crescimento neural, que se sabe ser positivo para as células derivadas da crista neural marcaram todos os 13 MM, de células fusiformes, testados por Kanik, Yaar e Bhawan.<sup>138</sup> Todos os MMD e MM neurotrópicos foram positivos, por vezes com uma marcação mais intensa do que com a PS100 o que poderá ser útil não só no diagnóstico diferencial com outras lesões de células fusiformes, sem origem na crista neural, como também na identificação das margens de excisão em MMD.<sup>138</sup> Iwamoto e col.<sup>139;313</sup> estudaram 11 MM de células fusiformes, dos quais 7 eram desmoplásicos, tendo todos estes expressado marcação positiva de P75 em pelo menos 10% das células tumorais e na maioria dos casos em mais de 50% das células tumorais, enquanto que foram negativos 10 dos 11 MM epitelíoides, usados como controle. Concluíram existir uma forte correlação entre a expressão de P75 e o fenótipo desmoplásico, muito importante para detectar o envolvimento peri-neural em MM.

**Ki-67** é um antigénio nuclear presente apenas nas células em fase proliferativa cujo papel no diagnóstico de MM é ainda discutível e a sua expressão em MMD pouco documentada. Em 2004, Kucher e col.<sup>314</sup> estudaram 31 MMD tendo observado marcação inferior a 5% do total dos melanócitos tumorais em 17 casos (55%), enquanto que em 6 dos casos (19%) observaram marcação focal superior a 30% das células.

**MPM-2** é um anticorpo específico de células em mitose que marca as proteínas fosforiladas reguladoras do ciclo celular reconhecendo topoisomerases II alfa do ADN que se

encontram concentradas nos centrómeros. Não encontramos qualquer referência bibliográfica da sua marcação em MMD.

Os marcadores de proliferação tumoral poderão ser comparados, em sentido figurado, aos pedais de acelerador e travão de um carro cujo motor, nesta analogia, seria o ciclo celular de mitoses:  $G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M$ . Assim, em qualquer tumor maligno existiria um acelerador de estimulação (*upregulation*), aqui representado por todas as Ciclinas e quinases dependentes de Ciclinas e um travão inibitório (*downregulation*), aqui representado pelos P16 e P27 e pelo PTEN (Quadro 12).

**Quadro 12. Regulação de marcadores de proliferação tumoral em MM<sup>64</sup>**

ESTIMULAÇÃO	INIBIÇÃO
CDK2	P16
CDK4	P27
Ciclina D1	PTEN
Ki-67	
P19	
P21	
RB	

**PTEN** é um inibidor da via do  $PI3K \rightarrow AKT$  cuja expressão se encontra fortemente diminuída em 13 (19%) de 69 MM estudados por Goel e col.<sup>315</sup> em 2006. Estes autores concluíram que a diminuição ou mesmo ausência de expressão de PTEN está associada com o aumento da espessura dos MM, não confere um aumento do risco da ocorrência de MM em doentes com doença de Cowden e não ocorre em nevos melanocíticos comuns.

**BRAF** mutação T→A no nucleótido 1796 foi encontrada em 23 de 57 MM convencionais enquanto que não foi detectada em nenhum dos 12 MMD testados por Davison e col.<sup>194</sup>

**N-caderina** foi testada em 21 MMD resultando a sua expressão fortemente positiva em 10 casos, focalmente positiva em 3 e negativa em 8. Sete dos 21 doentes tiveram metástases à distância e N-caderina foi fortemente positiva em 6 destes 7 casos o que parece sugerir que este

marcador poderá ser muito útil no reconhecimento de um sub-grupo de MMD com maior potencial metastático.<sup>316</sup>

**Fascina** é uma proteína de ligação cruzada com a actina importante na carcinogénese. Um estudo imuno-histoquímico efectuado em 73 lesões melanocíticas revelou positividade em 95% (19/20) dos nevos benignos, 67% (8/12) nevos displásicos, 25% (1/4) dos lântigos malignos, 28% (7/25) dos MM e em 25% (3/12) em metástases de MM.<sup>317</sup>

**CD13** (aminopeptidase-N) e Thy1 (CD90) são marcadores fibroblásticos, que revelaram uma marcação forte e difusa em 9 MM de células fusiformes, estudados por Winnepenninckx e col.<sup>318</sup> tendo sido observada uma marcação variável para a enzima hidroxilase-4-prolil (que está envolvida na formação de pró-colagénio) e ausência de expressão para os marcadores mesenquimatosos CD34 e actina do músculo liso (AML).

**Actina do músculo liso** está descrita ser positiva em algumas células fusiformes.<sup>319</sup> Discute-se a origem destas células: melanócitos neoplásicos ou células miofibroblásticas do estroma?

**CD34**<sup>320</sup> é quase sempre negativo nos MMD, ao contrário do que acontece no Dermatofibrosarcoma protuberans.<sup>87</sup>

**Glut-1** pertence à família dos transportadores de glicose através da membrana celular. É conhecido que o metabolismo da glicose está aumentado nas neoplasias malignas podendo ser evidenciado pela marcação das membranas celulares. Parente e col.<sup>321</sup> em 2008 testaram 44 lesões melanocíticas tendo observado positividade em 100% de nevos melanocíticos comuns (12/12), 75% dos nevos de Spitz (9/12) e em 45% dos MM (9/20), independentemente da sua espessura.

**Claudina** é uma proteína importante na formação da *tight junction* estando habitualmente localizada na membrana celular. Desempenha um papel activo no crescimento e na adesão das células e é responsável pela regulação do transporte paracelular de moléculas. A sua expressão é anormal em neoplasias da mama, ovário e MM entre outras. Nas lesões melanocíticas a sua expressão não se encontra apenas aumentada, como também, a sua localização na célula se torna aberrante aparecendo no núcleo de lesões melanocíticas benignas e no citoplasma de MM.<sup>322</sup> Foi demonstrado que não existe função de *tight junctions* nas células de MM em cultura e que a presença de claudina no citoplasma parece contribuir para o poder invasivo do MM através da activação de metaloproteinase 2.<sup>323</sup>

#### 4.3. Diagnóstico diferencial

Clinicamente o MMD pode ser confundido com lesões benignas e malignas. Os diagnósticos clínicos incluem: quisto epidermóide, cicatriz hipertrófica, dermatofibroma, neurofibroma e fibroxantoma atípico. Como muitas vezes não se suspeita de lesão maligna pode haver um atraso no diagnóstico ou mesmo um primeiro diagnóstico errado. O diagnóstico incorrecto pode provocar uma demora no tratamento e/ou inadequada ressecção cirúrgica, que pode resultar em recidiva local e eventual metastização, com diminuição do tempo de sobrevida.

Em cerca de metade dos casos o diagnóstico de MMD não é efectuado no primeiro relatório histológico, sendo confundido habitualmente com: processo inflamatório reactivo, infiltração linfocitária de Jessner-Kanof, cicatriz, fibroma, nevo de Spitz desmoplásico, neoplasia neural, fibrossarcoma ou qualquer outra neoplasia mesenquimatosa maligna.<sup>55</sup>

Uma combinação de critérios histológicos e imuno-histoquímicos permite a separação entre o MMD e os seus “simuladores”. Recordamos além disso, como elemento fundamental para o diagnóstico a positividade para proteína S100<sup>55</sup> e voltamos a salientar a necessidade de realização de painel de imuno-histoquímica. Em perspectiva histológica referem-se em seguida os principais elementos distintivos de algumas entidades com as quais o MMD pode ser confundido:

- Processo inflamatório esclerosante – o núcleo dos melanócitos tumorais tem contornos mais irregulares e é mais hipercromático do que o núcleo dos fibroblastos.
- Grandes cicatrizes – nestas o arranjo das fibras é mais regular e paralelo à epiderme e os capilares são verticais ou encontram-se orientados perpendicularmente às fibras de colagénio. É conhecido de todos que a persistência de MMD no local de biópsia prévia ou na cicatriz da excisão incompleta, origina uma mistura de cicatriz com uma neoplasia de células fusiformes, que pode também exibir aspectos de diferenciação fibroblástica. N. K. Kaneishi e C. J. Cockerell<sup>102</sup> publicaram em 1998, um estudo comparativo dos aspectos histológicos de 6 MMD e de 15 cicatrizes de vários tipos. Foi muito fácil efectuar a sua distinção com cicatrizes maduras. Em contraste as cicatrizes imaturas partilhavam muitos aspectos histológicos do MMD: hiper celularidade, infiltrados linfóides nodulares, estroma mixóide e atipia nuclear. A presença de uma proliferação melanocítica intraepitelial, por cima do componente dérmico, neurotropismo e células S100 e/ou HMB-45

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

positivas foram os únicos achados que permitiram uma separação entre as duas entidades. É sugerida correlação clínica, revisão das biópsias prévias e reexcisão com margens de segurança em todos os casos duvidosos. A distinção entre MMD e cicatriz pode ser muito difícil de efectuar no estudo microscópico de rotina, principalmente nas peças de alargamento cirúrgico de margens de segurança. Sabemos também que em todas as cicatrizes de exereses de lesões melanocíticas, não só de MM, como também de nevos comuns e atípicos, estão presentes células S100 positivas, o que pode constituir uma “armadilha”. Estas células foram testadas em peças de reexcisão de 10 nevos e de 10 MM por J. A. Chorny e por R. J. Barr<sup>104</sup> tendo sido negativa a sua marcação para HMB-45, Melan-A, CD57, CD1a, FXIIIa e GFAP, tendo revelado uma marcação difusamente positiva de todos os fibroblastos para NSE (*neuron specific enolase*). Estas células podem também ocorrer em re-excisões de tumores não-MM e corar com marcadores de diferenciação para células de Schwann como o P75NGFR, CD56/N-CAM e GAP-43 sugerindo tratar-se de uma proliferação reactiva de células de Schwann.<sup>324</sup> O aparecimento de lesões pigmentadas em cicatrizes cirúrgicas de melanoma é um achado frequente, que pode causar problemas de diagnóstico diferencial com persistência de melanoma. Este processo foi observado em 18 de 60 (30%) das cicatrizes de excisão de MM, estudadas por R. Botella-Estrada, O. Sanmartin e col.<sup>325</sup> de Valência que descreveram 3 tipos de lesões clínicas: lentiginosas, estrias pigmentadas e pigmentação difusa no enxerto. Histologicamente predominavam dois padrões: hiperplasia epitelial lentiginosa com hiperpigmentação e um número normal ou ligeiramente aumentado de melanócitos; um segundo padrão caracterizado por hiperplasia melanocítica de graus variados. O processo cicatricial em si parece ser o responsável pela pigmentação, independentemente do tipo de tumor excisado, actuando por indução dos melanócitos da epiderme que recobria o tumor.

- Recidiva de lesão de células fusiformes – é obrigatório proceder à revisão das lâminas da biópsia inicial e lembrar o possível diagnóstico de MMD.
- Nevo de Spitz desmoplásico – comparar os componentes epiteliais, a dimensão e a composição das lesões, os detalhes citológicos, presença de elastose solar e existência de diferenciação divergente, nomeadamente neural.
- Nevo desmoplásico, que para C. Requena e col.<sup>326</sup> quase sempre corresponde a nevo de Spitz desmoplásico - as suas semelhanças com o MMD incluem a presença de células

atípicas e a expressão de HMB-45 na porção superior das 2 lesões, mas a rara localização do nevo desmoplásico na cabeça e pescoço (1/16), a ausência de figuras de mitose (0/16) e um reduzido número de células reactivas para Ki-67 permitem a sua separação.<sup>327</sup>

- Nevo azul esclerótico e hipopigmentado com células fusiformes - os nevos azuis são habitualmente muito pigmentados. Está descrita a variedade amelanótica (ou hipomelanótica), que representa cerca de 2.7% (38/1358) do total de nevos azuis,<sup>328</sup> e que histologicamente é caracterizada por células fusiformes, ausência de melanina (Perl's negativo e Fontana-Masson variável) e um estroma fibroso habitualmente. O seu diagnóstico diferencial principal é com o dermatofibroma, mas a sua separação do MMD pode ser difícil. Habitualmente são lesões com vários anos de evolução, sem alterações clínicas recentes, em adultos jovens, histologicamente não se observa pleomorfismo celular, nem aumento da actividade mitótica e a sua marcação imuno-histoquímica é muito fraca para S100, positiva para HMB-45<sup>329</sup> e fortemente positiva para Mel-5.<sup>328</sup>
- Neoplasias com diferenciação neural – nomeadamente com o neurofibroma quando o componente mixóide é acentuado e com o tumor maligno das bainhas nervosas dos nervos periféricos, que é habitualmente de localização mais profunda (hipoderme).
- Neoplasias mesenquimatosas não-neurais como o piloleiomioma, leiomiosarcoma, fibroxantoma atípico de células fusiformes,<sup>330</sup> fibrosarcoma, dermatofibrosarcoma *protuberans* e a sua variante pigmentada, tumor de Bédnar. Habitualmente todos estes tumores são mais celulares do que o MMD.
- Carcinoma espinocelular de células fusiformes, talvez o diagnóstico diferencial histológico mais frequente e difícil, sendo por vezes necessário recorrer a estudos de microscopia electrónica ou de imuno-histoquímica. Este tumor é positivo para citoqueratinas e negativo para proteína S100.<sup>331</sup>
- O leiomiosarcoma desmoplásico, também denominado leiomiosarcoma cutâneo esclerótico primário, assemelha-se ao MMD pela escassa celularidade e abundante estroma, tornando a sua separação muito difícil em pequenas biópsias.<sup>332</sup>
- O Linfoma sarcomatóide de células B foi acrescentado recentemente à lista de diagnóstico diferencial dos tumores malignos de células fusiformes, apesar de ser fácil a sua individualização após estudo imuno-histoquímico, pois é S100 negativo e CD45 e CD20 positivo.<sup>333</sup>

#### 4.4. Prognóstico

O prognóstico do MMD tem vindo a alterar-se ao longo do tempo. Assim, os primeiros casos descritos de MMD pareciam estar associados a um pior prognóstico devido ao restrito número de casos estudados e provavelmente diagnosticados em estádios mais avançados. Na década de 90 do século passado pensava-se que a desmoplasia estaria associada com um melhor prognóstico. No entanto após a publicação da série australiana de 280 doentes, em 1998, por Quinn e col.<sup>280</sup> o prognóstico do MMD parece estar relacionado com a espessura tumoral à semelhança do que ocorre na generalidade dos MM.

Inicialmente associado a pior prognóstico por Conley e col.<sup>267</sup>, que afirmaram em 1971 na *Cancer* “...*highly malignant stubbornly recurring and often metastasizing tumors...*” pois num total de 7 MMD observou recidiva local em 5 doentes, metástases ganglionares em 3 doentes e metástases sistémicas em 4 doentes, assim como por Egbert e col.<sup>334</sup> que publicaram em 1988, também na *Cancer*, o estudo de um grupo de 23 doentes com MMD, em que 12 tiveram recidivas locais, 5 metástases para os gânglios linfáticos e 3 metástases sistémicas. Concluíram que o MMD “...*is more aggressive than other types of MM...*”. A crítica que se pode fazer a estes dois trabalhos é que os autores não forneceram informação acerca da espessura tumoral, da presença ou não de ulceração, assim como do índice mitótico.

Autores como Walsh e col.<sup>299</sup> em 1988, Skelton e col.<sup>282</sup> em 1995 e Carlson e col.<sup>230</sup> em 1995 afirmaram que “...*although DM is associated with higher rates of local recurrence, survival times were longer than they were for patients with conventional types of MM of similar thickness...*” Hawkins e col.<sup>335</sup> concluíram que devido à rara metastização dos MMD para as cadeias ganglionares regionais e apesar da possibilidade de ocorrerem metástases à distância, o MMD tem um prognóstico melhor quando comparado com outros tipos de MM com a mesma espessura.

Quinn e col.<sup>280</sup> na sua revisão de 280 doentes com MMD publicada em 1998, concluíram que o prognóstico seria idêntico “...*a large recent series from the Sidney Melanoma Unit did not detect any difference in survival rates between patients with DMs and those with conventional MM...*”

Em perspectiva prognóstica é fundamental realçar a heterogeneidade fenotípica do MMD. Busam e col.<sup>336</sup> propõem a separação do MMD, em duas variantes, de acordo com a quantidade de estroma. Assim, a variante “pura” quando a desmoplasia predomina no tumor ( $\geq$  a 80%) e a variante “combinada ou mista” quando existam focos de desmoplasia dispersos

num tipo de MM “convencional”. Após estudar 92 doentes com MMD, 55 na variante pura e 37 na variante mista, concluiu que esta separação tem importância prognóstica, pois a variante pura parece estar associada a uma maior sobrevida, livre de doença.

Estes resultados foram confirmados pelo estudo de Hawkins e col.<sup>335</sup> em 2005, após terem comparado um grupo de 131 doentes com MMD (92 puros e 39 mistos ou combinados) com um grupo de 3976 doentes com MM convencionais. A espessura tumoral média foi superior a 2 mm em 73% dos doentes com MMD, enquanto se observou apenas em 31% da totalidade dos doentes com MM. Metástases ganglionares regionais foram muito raras nos doentes com a variante pura de MMD (1%), quando comparadas com os grupos da variante mista de MMD (10%) ou do MM em geral (6%) (MMD puros vs. MM em geral;  $p < 0.05$ ). A mortalidade relacionada com o MM, aos 5 anos, foi muito inferior nos doentes com a variante pura de MMD quando comparados com a variante mista de MMD (11% vs. 31%;  $p < .01$ ). Doentes com a variante pura de MMD e de MM em geral tiveram uma mortalidade semelhante, relacionada com o MM, apesar da diferença tripla na espessura tumoral média (3.6 vs. 1.2 mm, respectivamente).

Num editorial de 2005 dos *Annals of Surgical Oncology*, Scolyer e col.<sup>337</sup> chamaram a atenção para a heterogeneidade dos MMD insistindo na necessidade de uma definição precisa do grau de desmoplasia e subsequente separação desta variedade de MM em duas variantes: puras e mistas ou combinadas quando o grau de desmoplasia era superior ou inferior a 80%, respectivamente.

Quando comparada com as diversas variedades de MM é conhecida a maior tendência do MMD para a recidiva local e a menor propensão para a metastização ganglionar. Além disso, a separação das duas variantes histopatológicas de MMD, puras e mistas, parece condicionar diferenças consideráveis quanto ao número de recidivas locais (7% vs 2%), percentagem de envolvimento ganglionar regional (0% vs 12%) e taxa de mortalidade aos 5 anos (11% vs 31%), respectivamente.

O facto de a invasão para os gânglios linfáticos regionais ocorrer raramente, põe em causa a utilidade da realização de biópsia do gânglio sentinela, por rotina, como procedimento diagnóstico e de estadiamento prognóstico.<sup>288;289;338-340</sup> Como é habitualmente negativa no MMD e não é um procedimento isento de riscos, devemos ponderar a sua utilidade neste tipo biológico particular de MM.<sup>286;288</sup>

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

O local preferencial de metastização à distância foi o pulmão, 81% na série de Jaroszewski e col.<sup>286</sup> e 58% na série de Livestro e col.<sup>303</sup> Nesta última série de 12 doentes com metástases à distância, estas localizaram-se por ordem decrescente de frequência em: pulmão, osso, S.N.C., fígado, área gastro-intestinal, pele, supra-renal e peritoneu.

O tratamento de eleição continua a ser a excisão cirúrgica do tumor na sua totalidade, com margem de segurança. A abordagem cirúrgica é difícil pois o tumor localiza-se frequentemente na face e a recidiva local está muitas vezes associada a margens livres cirúrgicas inferiores a 1 cm. Este achado é importante pois sabe-se que metade dos doentes com recidiva local, evoluíram para doença metastática.<sup>286</sup>



**Estudo Clínico, Histopatológico, Imuno-histoquímico e  
Estatístico do Melanoma Maligno Desmoplásico**

5.1. Objectivos de estudo

Após a descrição inicial do MMD efectuada por Conley e col.<sup>267</sup> foram publicados algumas dezenas de trabalhos, quatro dos quais contendo mais do que uma centena de doentes<sup>280-282;335</sup> apesar de o MMD ser considerado uma variedade rara de MM.

A investigação reportada nesta tese usa 113 casos, obtidos pelo autor no âmbito da sua colaboração com Arno Rütten, Heinz Kutzner e Claus Garbe. Muitos desses casos tiveram um diagnóstico clínico inicial “errado” (de facto, o diagnóstico clínico de MMD é difícil, e um dos nossos objectivos foi tentar evidenciar associações que alertassem os clínicos para a possibilidade de o diagnóstico apropriado ser MMD), sendo o diagnóstico de MMD confirmado posteriormente, por histologia e com recurso à imunoreactividade para a proteína S100 e vimentina, acompanhada de resultados negativos para citoqueratinas, desmina e CD31, no Laboratório *Dermatopathologie Friedrichshafen, Bodensee*, na Alemanha.

Houve, para estes 113 casos recolhidos ao longo de 20 anos, o registo de observações demográficas (idade, sexo), clínicas (diagnóstico inicial, localização do tumor) e de vinte variáveis histológicas, referidas atrás.

Posteriormente, procurou obter-se dos dermatologistas assistentes dados sobre sobrevivência, recorrência local, invasão de gânglios linfáticos e metástases sistémicas, tendo sido obtidas informações da evolução clínica de 55 dos 113 casos. Não havendo, no entanto, indicações sobre protocolos de tratamento — por exemplo duração e doses de quimio ou radioterapia, ou indicação da margem de segurança e profundidade de excisão — a análise de

sobrevivência é um exercício sem objectivos práticos. Por outro lado, a indicação sobre recorrência local, invasão de gânglios linfáticos e metástases sistémicas, nos casos em que existiu, foi obtida sob a forma de ano de ocorrência, o que é uma indicação demasiado vaga para ser passível de uma investigação quantitativa com interesse.

Em síntese os objectivos do nosso estudo foram:

- Análise das características clínicas de uma série de 113 doentes com MMD.
- Análise das características histopatológicas das lesões.
- Análise da utilidade das técnicas imuno-histoquímicas no diagnóstico.
- Pesquisa da mutação V600E no gene *BRAF* por PCR.
- Análise estatística exploratória dos resultados de um estudo imuno-histoquímico em 15 desses 113 casos.

## 5.2. Material e Métodos

Revimos **113 casos de doentes com MMD** diagnosticados no Laboratório *Dermatopathologie Friedrichshafen, Bodensee*, na Alemanha, durante o período de 20 anos, que medeou **entre 1988 e 2007**.

Efectuou-se compilação da informação clínica dos doentes, contida nas requisições que acompanhavam as amostras de pele estudadas no Laboratório, tendo-se registado **4 variáveis clínicas: idade, sexo, localização e diagnóstico clínico**.

Com recurso ao contacto do médico assistente, por carta e por telefone, complementado com os dados colhidos no registo oncológico alemão (responsável Professor Doutor Claus Garbe) foi possível saber a evolução clínica de 55 doentes, nomeadamente a situação do doente quanto à **presença ou ausência de recidiva local** da doença e de **metastização ganglionar e/ou sistémica**, se o doente se encontrava **vivo ou morto** e, neste caso, se a morte teve relação, ou não, com o MMD.

## ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E ESTATÍSTICO

Utilizaram-se as lâminas histológicas coradas por hematoxilina e eosina (H&E), as respectivas requisições de pedido do estudo diagnóstico histopatológico, assim como blocos de parafina existentes em arquivo, que serviram para a obtenção de novos cortes para realização de imuno-histoquímica.

As peças de ressecção foram fixadas, imediatamente após a sua excisão, em formol tamponado a 4%. As margens das peças de excisão cirúrgica foram pintadas com tinta-da-china e a lesão, na sua totalidade, foi colocada em cassetes plásticas numeradas. O processamento pelo método histológico de rotina consistiu na desidratação (por passagens sucessivas em álcoois a diferentes concentrações), clarificação com xilol e infiltração por parafina. Após o processamento, os fragmentos de pele a estudar, foram incluídos em parafina que solidificou por arrefecimento, resultando um bloco com fragmento identificado.

De cada bloco obtiveram-se cortes com espessura de 4 a 6  $\mu$ , colados em lâmina de vidro e secos em estufa. Os cortes foram corados por H&E e observados em microscopia óptica.

Procedeu-se à observação de todas as lâminas coradas por H&E e ao registo e análise de **20 variáveis histológicas:**

1. Grau de desmoplasia.
2. Componente intraepitelial.
3. Envolvimento folicular.
4. Elastose solar.
5. Ulceração.
6. Nível de Breslow (espessura em mm).
7. Grau de Clark.
8. Envolvimento neural.
9. Invasão vascular.
10. Padrão celular (forma dos melanócitos e dos seus núcleos).
11. Índice mitótico.
12. Pigmento melânico.
13. Agregados linfóides.
14. Infiltrado inflamatório.

15. Regressão (definida como fibrose da derme papilar, ectasia capilar, infiltrado inflamatório linfocitário e atrofia da epiderme).
16. Variação de espessura da epiderme.
17. Faixa de Grenz.
18. Nevo associado.
19. Mucina.
20. Metaplasia cartilaginosa ou óssea.

### **Imuno-histoquímica**

Devido à extensão da série, à necessidade de obtenção de novos cortes e também devido ao elevado custo dos reagentes para a realização de estudo imuno-histoquímico seleccionámos de entre os casos mais recentes, 15 MMD, 10 do sexo masculino e 5 do sexo feminino, com material suficiente nos blocos para a realização de estudo-piloto de imunomarcção com **25 marcadores** cujas características se indicam no Quadro 13:

- Marcadores de diferenciação melanocítica:
  - S-100.
  - HMB-45.
  - Melan-A.
  - Tirosinase.
  - MITF.
  - CD117.
  - P75.
  
- Marcadores de progressão e sinalização tumoral:
  - Ki-67.
  - MPM-2.
  - Ciclina D1.
  - CDK2.
  - CDK4.
  - RB.
  - P16.

## ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E ESTATÍSTICO

- P19.
  - P21.
  - P27.
  - PTEN.
- Marcadores das células do estroma:
- N-caderina.
  - Fascina.
  - CD13.
  - Actina do músculo liso 1A4.
  - CD34.
  - GLUT-1.
  - Claudina.

Foram efectuados controlos positivos externos para cada um dos marcadores utilizados e observados os controlos internos como teste de qualidade da marcação.

Como controle negativo foi utilizada a técnica de substituição do anticorpo primário por soro animal não-imune, diluído na mesma concentração do anticorpo primário.

Foi utilizada a técnica da APAAP (fosfatase alcalina - anti-fosfatase alcalina), usando-se um cromogénio indol – aminoetilcarbazol que origina uma marcação vermelha sendo por isso recomendada para o estudo de lesões melânicas, por facilitar a sua separação do pigmento castanho da melanina.

Os cortes sujeitos à técnica imuno-histoquímica foram estudados para se proceder ao registo do local citológico da marcação (núcleo, citoplasma e/ou membrana celular) e a sua positividade graduada, de forma semi-quantitativa, entre 0 (marcação negativa) e +++ (marcação máxima) de acordo com a percentagem de células tumorais positivas para cada marcador:

- 0, sem marcação ou com raras células marcadas (igual ou inferior a 5% do seu total);
- +, poucas células marcadas (aproximadamente entre 5% e 25% do seu total);
- ++, cerca de metade das células marcadas (aproximadamente entre 25% e 75%);
- +++, praticamente todas as células marcadas (mais de 75% do seu total).

MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

Quadro 13. Características dos anticorpos usados no estudo imuno-histoquímico

MARCADOR	ANTICORPO	FONTE	COMPANHIA	DILUIÇÃO	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA
S100	Policlonal	Coelho	DAKO, Hamburgo/Alemanha	1:2000	Pré-digestão com Proteinase K
HMB-45	Monoclonal, HMB-45	Rato	DAKO, Hamburgo/Alemanha	1:300	pH 6.1
Melan-A	Monoclonal, A103	Rato	DAKO, Hamburgo/Alemanha	1:1000	pH 9.0
Tirosinase	Monoclonal, T311	Rato	Invitrogen, Karlsruhe/Alemanha	1:200	pH 9.0
MITF	Monoclonal, D5	Rato	DAKO, Hamburgo/Alemanha	1:100	pH 9.0
CD117	Policlonal	Coelho	DAKO, Hamburgo/Alemanha	1:100	-
P75	Monoclonal NGFR5	Rato	Abcam, Cambridge/UK	1:200	pH 6.1
Ki-67	Monoclonal SP6	Coelho	medac, Wedel/Alemanha	1:200	pH 9.0
MPM-2	Monoclonal IF2	Rato	Invitrogen, Karlsruhe/Alemanha	1:200	pH 9.0
Ciclina D1	Monoclonal P2D11F11	Rato	Menarini, Neuss/Alemanha	1:50	pH 9.0
CDK2	Monoclonal 2B6	Rato	Invitrogen, Karlsruhe/Alemanha	1:200	pH 9.0
CDK4	Monoclonal DCS-31	Rato	Invitrogen, Karlsruhe/Alemanha	1:400	pH 9.0
RB	Monoclonal 13A10	Rato	Menarini, Neuss/Alemanha	1:300	pH 9.0
P16	Monoclonal JC8	Rato	Biomol, Hamburgo/Alemanha	1:200	pH 6.1
P19	Monoclonal DCS-100.1	Rato	Menarini, Neuss/Alemanha	1:30	pH 9.0
P21	Monoclonal SX118	Rato	DAKO, Hamburgo/Alemanha	1:100	pH 9.0
P27	Monoclonal SX53G8	Rato	DAKO, Hamburgo/Alemanha	1:200	pH 9.0
PTEN	Monoclonal 6H2.1	Rato	DAKO, Hamburgo/Alemanha	1:3000	pH 9.0
N-Caderina	Monoclonal 6G11	Rato	DAKO, Hamburgo/Alemanha	1:50	pH 9.0
Fascina	Monoclonal 55K-2	Rato	DAKO, Hamburgo/Alemanha	1:8000	pH 6.1
CD13	Monoclonal 38C12	Rato	Menarini, Neuss/Alemanha	1:160	pH 9.0
AML	Monoclonal 1A4	Rato	DAKO, Hamburgo/Alemanha	1:500	pH 9.0
CD34	Monoclonal My10	Rato	Becton-Dickinson, Heidelberg/Alemanha	1:100	pH 6.1
GLUT-1	Policlonal	Rato	Zytomed Systems, Berlin/Alemanha	1:100	pH 6.1
Claudina-1	Policlonal	Coelho	Invitrogen, Karlsruhe/Alemanha	1:600	pH 6.1

### **Pesquisa da mutação do gene *BRAF* por PCR**

Condições para PCR em cortes de parafina – *Primers* específicos para o exão 15 da região do *BRAF* e contendo aproximadamente cerca de 50 bases de flaqueamento do referido exão<sup>188</sup> amplificaram um produto com 223 pares de bases. O *primer* reverso estava marcado com biotina. A PCR foi realizada num termociclador (*MJ Research, Inc, Watertown, Massachusetts*) usando volumes de 25 µl com 50 ng de ADN, 100 pmol de cada *primer*, 10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de cada dNTP, 1,5 U *Taq*-Polimerase. A temperatura inicial foi de 60°C, diminuindo para 50°C no final de 35 ciclos. Após a separação em gel de agarose a 2% (50 mA durante 30 minutos) e coloração com brometo de etídio, o produto de PCR era visualizado sob radiação UV (302 nm). Todas as amostras foram submetidas a controlo por PCR usando *primers* específicos para o exão 10 do gene do factor V. Cada conjunto de PCRs foi realizado com pelo menos um controlo positivo (contendo a mutação T1796A) e um controlo negativo (mistura sem ADN).

Sequenciação – Todos os produtos de PCR usados para sequenciação directa foram purificados com *dynabeds* (DYNAL, Hamburg) ligando-se ao *primer* reverso marcado com biotina e a sequenciação foi realizada num sequenciador automático *ALF Express* (*Amersham Biosciences*, Suécia) utilizando o kit de sequenciação *ALF Express AutoRead* (*Amersham Biosciences*, Suécia) e o kit *Cy 5 Dye Terminator* (*Amersham Biosciences*, Suécia).

### **Métodos estatísticos**

Os dados clínicos, histológicos e imuno-histoquímicos geraram extensa base de dados, com variáveis nominais, ordinais e intervalares, passíveis de tratamento estatístico diversificado.

No que se refere às **variáveis nominais** — em que 0 e 1 codificam respectivamente a ausência e a presença de uma qualidade — o tratamento univariado limita-se ao estudo de proporções; quando se constroem tabelas de contingência (que neste caso são as clássicas tabelas de margens livres), podemos testar a independência e progredir para estudos de associação quando a hipótese nula de independência é rejeitada. O tratamento de tabelas bidimensionais é habitualmente feito com o teste de qui-quadrado para avaliar a discrepância entre valores observados e valores esperados sob a hipótese nula de independência, mas note-se que a verdadeira distribuição de base é função de uma variável multinomial, discreta, enquanto

a aproximação por um qui-quadrado, originalmente feita por Pearson no dealbar do século XX, nos leva a usar uma variável aleatória contínua.

Essa aproximação só tem qualidade quando todos os valores esperados são superiores a 5, o que nalgumas das variáveis estudadas não aconteceu. Nesses casos procedeu-se a cálculos exactos, com a metodologia de Fisher.<sup>341</sup>

Anote-se ainda que há disponível no mercado, já há vários anos, um *package* estatístico *XactStat* que tem algoritmos muito sofisticados para fazer cálculos exactos, e que esse progresso tem vindo a ser implementado por outros *packages* de sucesso, como o *SPSS*.

O estudo de tabelas multidimensionais teve um salto qualitativo grande em meados do século XX, com a introdução de modelos log-lineares. Nesse caso os cálculos são fastidiosos e só com recurso a programas adequados podem ser realizados de forma expedita, tendo nós usado o programa *R*, de distribuição livre, que pode ser obtido em <http://www.r-project.org/>.<sup>342</sup>

Na estatística de teste do qui-quadrado, cada uma das parcelas é, em si mesma, uma variável de qui-quadrado com 1 grau de liberdade, e assim qualquer valor observado da diferença quadrática relativizada entre valores observados e valores esperados, superior ao quantil 0.95 do qui-quadrado 1 — isto é, superior a 3.84, deve pôr-nos de sobreaviso, e eventualmente ser em si mesmo um argumento para rejeitar a hipótese nula. A discussão sobre sub-tabulação ilumina este ponto.<sup>341</sup>

– O ficheiro original continha dados de observação de casos diagnosticados de MMD; foi *a posteriori* que obtivemos dados sobre sobrevivência, de cerca de metade dos casos do ficheiro original (55/113). Houve assim uma variável resposta, que nos permitiu avançar a análise, e em particular obter resultados objectivos quando a variável COLAGÉNIO (desmoplasia) era usada para separar MMD “puro” de “misto/combinado”.

Do estudo imuno-histoquímico (15 casos), os resultados estão expressos na escala ordinal, codificados com os símbolos 0, +, ++ ou +++; estes símbolos são portanto “nomes” que correspondem a percentagens de células coradas, e como tal passíveis de tratamento com métodos não paramétricos para dados ordinais. Utilizámos *ranks* e não magnitudes, tendo tido o cuidado de usar *ranks* médios dos diversos casos empatados, habitualmente designados por *ranks* ajustados. Anote-se que a existência de grupos de dados empatados e concomitante uso de *ranks* ajustados altera o cálculo da variância, e que em rigor se deveria usar uma correcção do

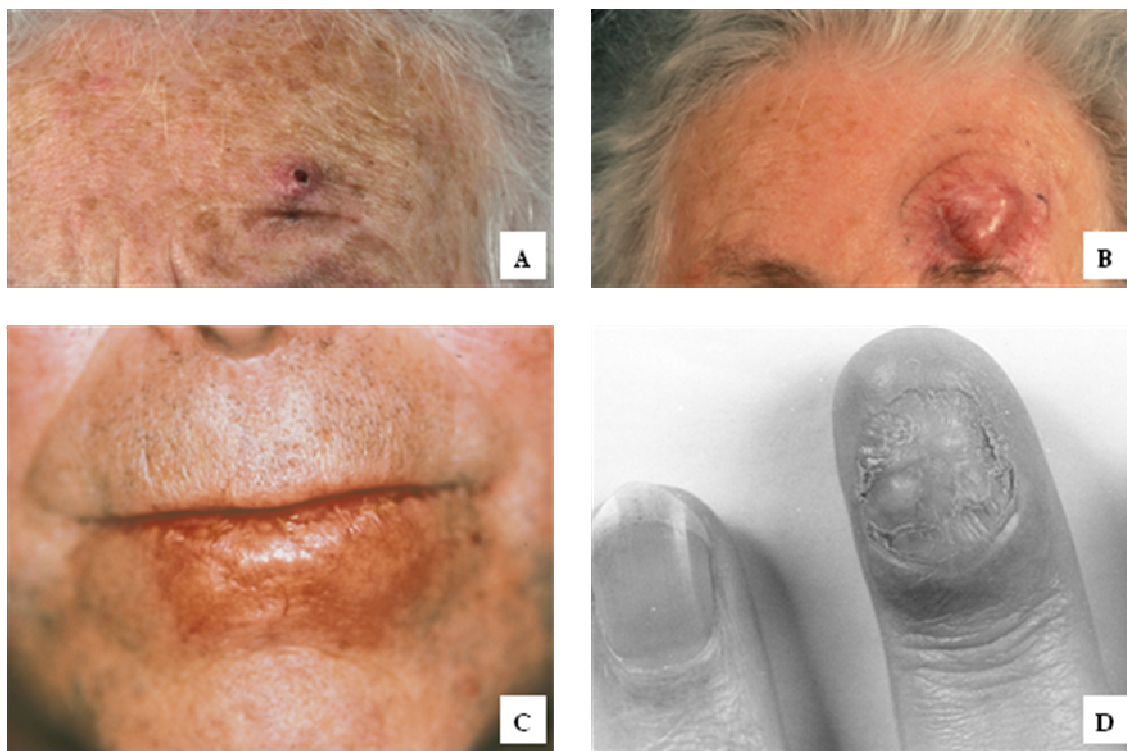
valor observado da estatística de teste; não o fizemos, no entanto, por a qualidade dos dados pôr em dúvida a relevância dessa prática.

Utilizámos como fontes documentais de métodos estatísticos, adequados para este tipo de dados, livros de métodos estatísticos paramétricos e não paramétricos.<sup>343-345</sup>

### 5.3. Resultados

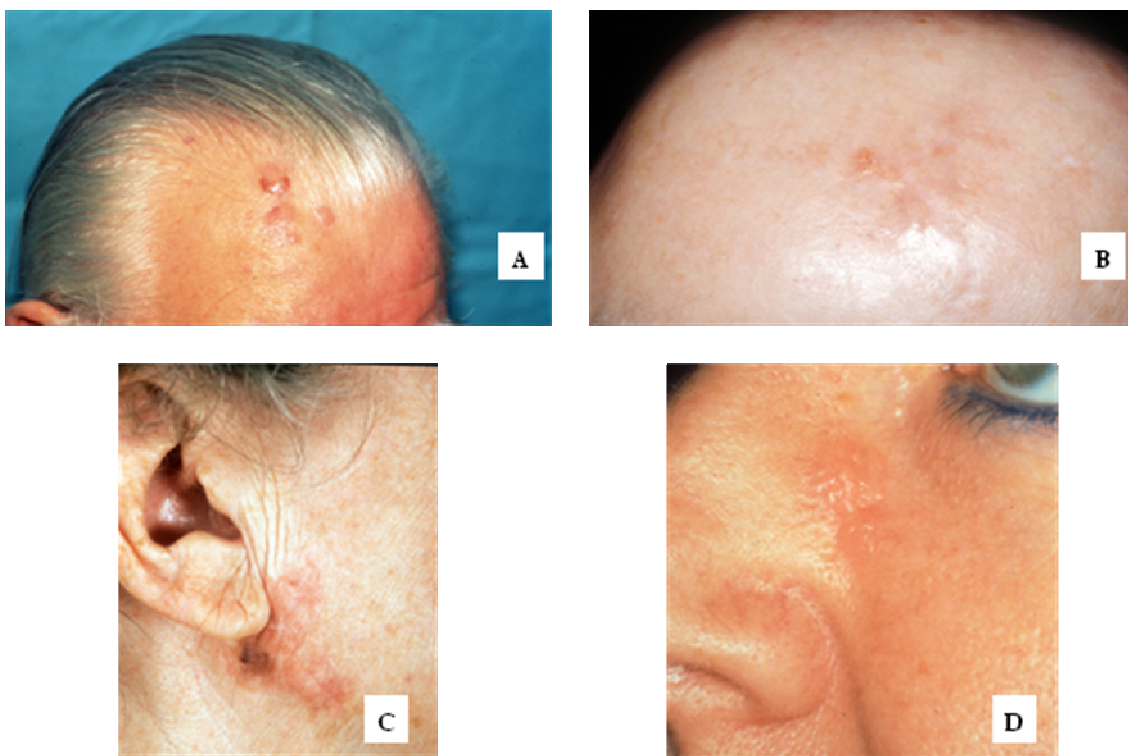
#### 5.3.1. Clínicos e de correlação clínico-patológica

Algumas fotografias clínicas de MMD são apresentadas nas Figuras 1 a 3.



**Figura 1.** Localizações anatómicas distintas de MMD: A e B - região frontal, C - lábio inferior, D - subungueal.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO



**Figura 2.** Lesões amelanóticas de MMD simulando: A - verrugas vulgares, B - queratoses actínicas, C - tumor indiferenciado, D - basalioma.



**Figura 3.** Lesões pigmentadas de MMD simulando: A e C - carcinoma espinocelular, B - verruga seborreica, D - melanoma maligno.

## ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E ESTATÍSTICO

A informação clínica obtida a partir das requisições que acompanharam as biópsias ou as peças de excisão estão resumidas no Quadro 14.

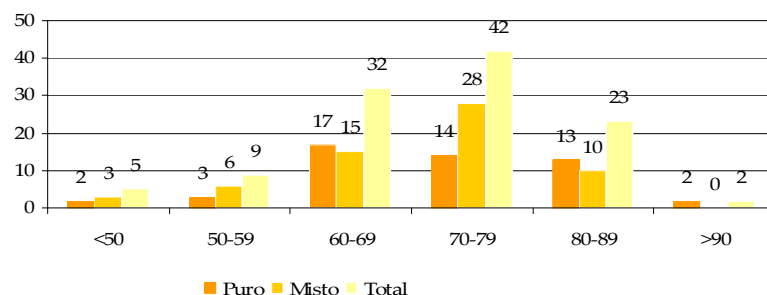
**Quadro 14. Dados clínicos dos 113 doentes com Melanoma desmoplásico**

	MMD (GRAU DE DESMOPLASIA)		
	MMD PURO (n=51)	MMD MISTO (n=62)	TOTAL DE MMD (n= 113)
<b>Idade média (variação) em anos</b>	72.2 (46-92)	70.1 (43-85)	71.1 (43-92)
<60 / ≥60 anos	5/46	9/53	14/99
<b>Sexo</b>			
Masculino	27 (53%)	27 (44%)	54 (48%)
Feminino	24 (47%)	35 (56%)	59 (52%)
<b>Localização anatómica</b>			
Cabeça e pescoço	38 (74%)	46 (74%)	84 (75%)
Tronco	7 (14%)	9 (15%)	16 (14%)
Membros	1 (2%)	5 (8%)	6 (5%)
Desconhecida	5 (10%)	2 (3%)	7 (6%)
<b>Diagnóstico clínico</b>			
Benigno	14 (27%)	20 (32%)	34 (30%)
Melanoma Maligno	16 (31%)	15 (24%)	31 (27%)
Tumor maligno não-MM	15 (29%)	25 (40%)	40 (36%)
Desconhecido	6 (13%)	2 (4%)	8 (7%)

A idade média dos doentes foi de 71.1 anos (72.2 para os MMD puros / 70.1 para os MMD mistos), a mediana de 72 anos (74/71), com uma variação entre os 43 e os 92 anos de idade, com apenas 14 doentes (5/9) com menos de 60 anos de idade, conforme esquematizado no Gráfico 1.

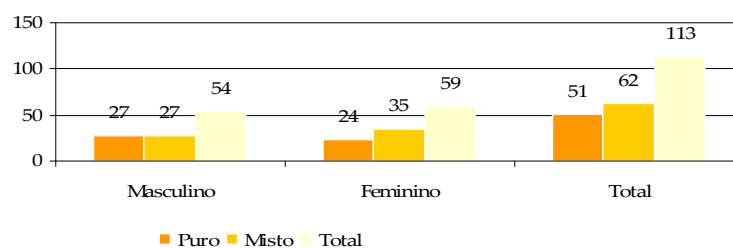
## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

**Gráfico 1. Idade dos doentes com MMD**



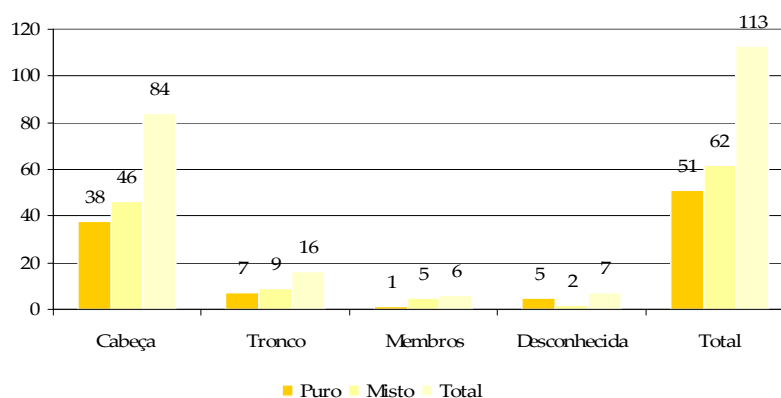
A série corresponde a 54 homens (27 para os MMD puros /27 para os MMD mistos) e 59 mulheres (24/35), com um predomínio de doentes do sexo masculino na variante pura de MMD (27/24) e do sexo feminino na variante combinada (27/37) conforme Gráfico 2.

**Gráfico 2. Sexo dos doentes com MMD**



A neoplasia localizava-se na cabeça e pescoço em 84 doentes (7 no couro cabeludo, 74 na face e 3 no pescoço), em 16 casos no tronco (7 dos quais no dorso), em 6 casos nos membros (4 casos nas extremidades superiores e 2 casos nas extremidades inferiores). Em 7 casos a localização não constava nos registos, conforme a representação mostrada no Gráfico 3.

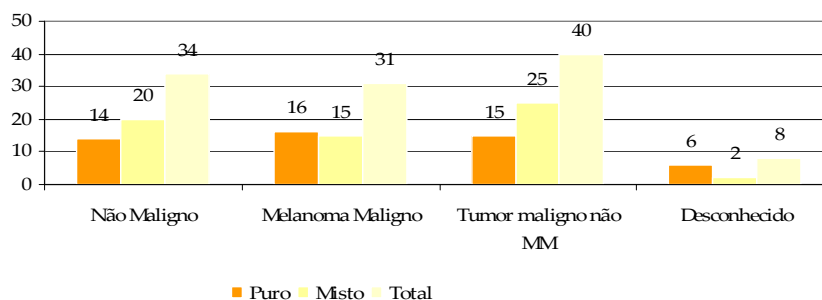
**Gráfico 3. Localização anatómica do MMD**



## ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E ESTATÍSTICO

O diagnóstico clínico de MM foi colocado como primeira hipótese diagnóstica em 31 casos (16 para MMD puros / 15 para MMD mistos). Outros tumores malignos não-MM foram suspeitados clinicamente em 40 casos (15/25): basalioma em 24, carcinoma espinocelular em 4, fibroxantoma atípico e dermatofibrosarcoma *protuberans* em apenas um caso cada e em 10 casos foi colocada a hipótese clínica de tumor maligno “apenas”. Diagnóstico clínico de lesão não maligna foi colocado em 34 casos (14/20): queratose actínica em 6, cicatriz e verruga seborreica em 3 casos cada e foi colocada a hipótese clínica de hemangioma, lipoma, leiomioma e foliculite em apenas 1 caso cada. Desconhece-se a hipótese diagnóstica clínica colocada em 8 casos conforme representação no Gráfico 4.

**Gráfico 4. Diagnóstico clínico em doentes com MMD**



Do total de 113 doentes da nossa série obtivemos informação da evolução clínica de 55 doentes (26/29). O tempo de seguimento foi em média de 55 meses (variou entre 1 e 177 meses) tendo-se registado recidiva local em dois doentes (1/1), invasão ganglionar regional num outro caso (0/1) e metastização sistémica em 5 casos (1/4). Sete dos 55 pacientes morreram de MMD, 2 com a variante pura e 5 com a variante combinada, conforme esquematizamos nos Quadros 15 e 16.

Cerca de metade dos doentes foram seguidos por um período superior a 3 anos, 47% com a variante pura de MMD e 51% com a variante mista ou combinada.

MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

**Quadro 15. Consultas de seguimento dos doentes com MMD**

	VARIANTES DE MMD		
	PURO (n=26)	MISTO (n=29)	TOTAL (n=55)
Tempo de seguimento (meses)			
Média	51	58	55
Máximo	169	177	177
Mínimo	2	1	1
<i>Status</i>			
Vivo	24	23	47 (86%)
MMM	2	5	7 (12%)
MOD	0	1	1 (2%)
Recidiva local			
Presença	1	1	2 (4%)
Ausência	25	28	53 (96%)
Invasão ganglionar			
Presença	0	1	1 (2%)
Ausência	26	28	54 (98%)
Metástases sistémicas			
Presença	1	4	5 (9%)
Ausência	25	25	50 (91%)

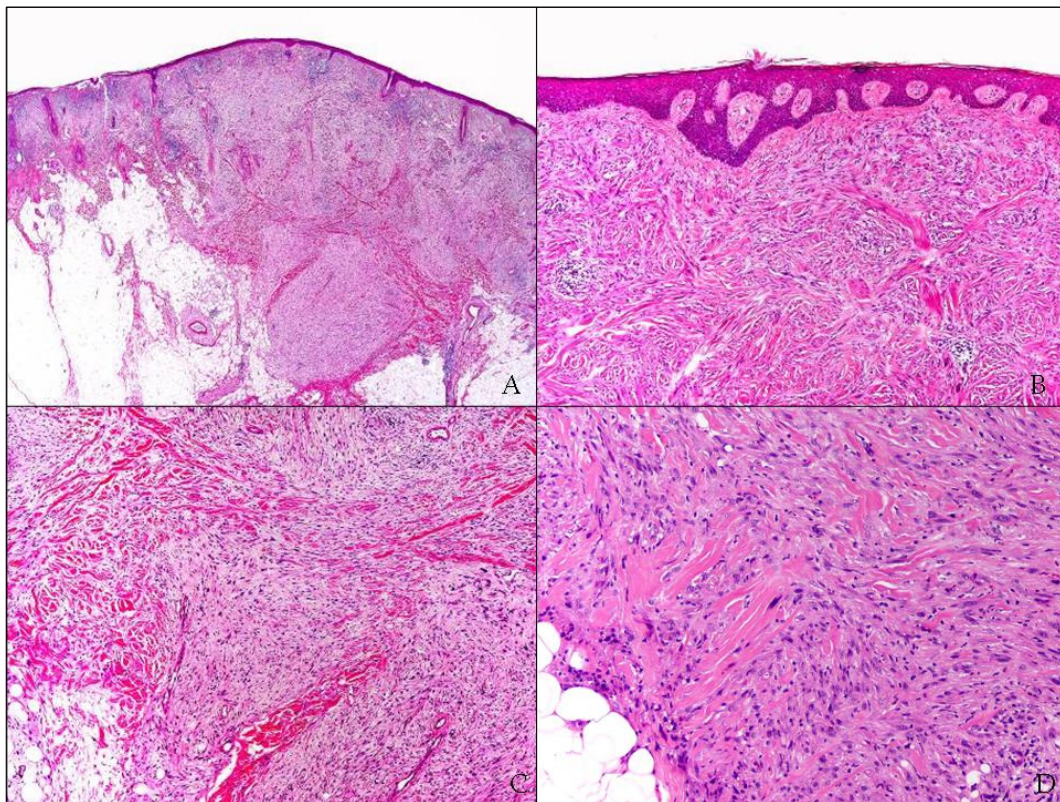
MMM, morte associada ao melanoma; MOD, morte por outra doença.

**Quadro 16. Tempo de seguimento dos doentes com MMD**

TEMPO EM MESES	MMD PURO (n=26)	MMD MISTO (n=29)	TOTAL (n=55)
1 -≤12	3 (11%)	9 (31%)	12 (22%)
13-≤24	6 (23%)	2 (7%)	8 (14%)
25-≤36	5 (19%)	2 (7%)	7 (13%)
37-≤48	2 ( 8%)	3 (10%)	5 ( 9%)
49-≤60	1 ( 4%)	0	1 ( 2%)
>60	9 (35%)	13 (45%)	22 (40%)

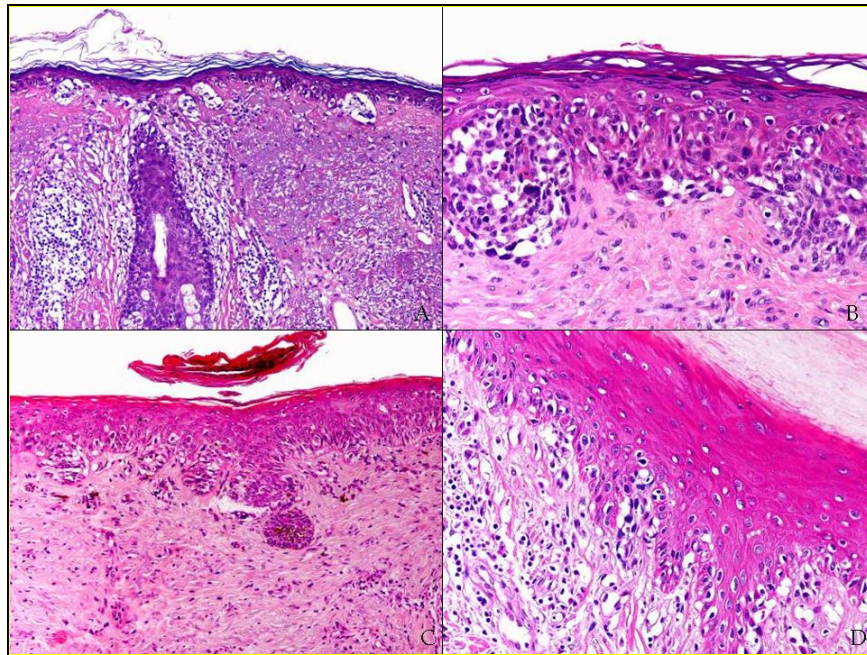
5.3.2. Histopatológicos

Alguns aspectos histopatológicos de MMD em H&E estão representados nas Figuras 4 a 9.

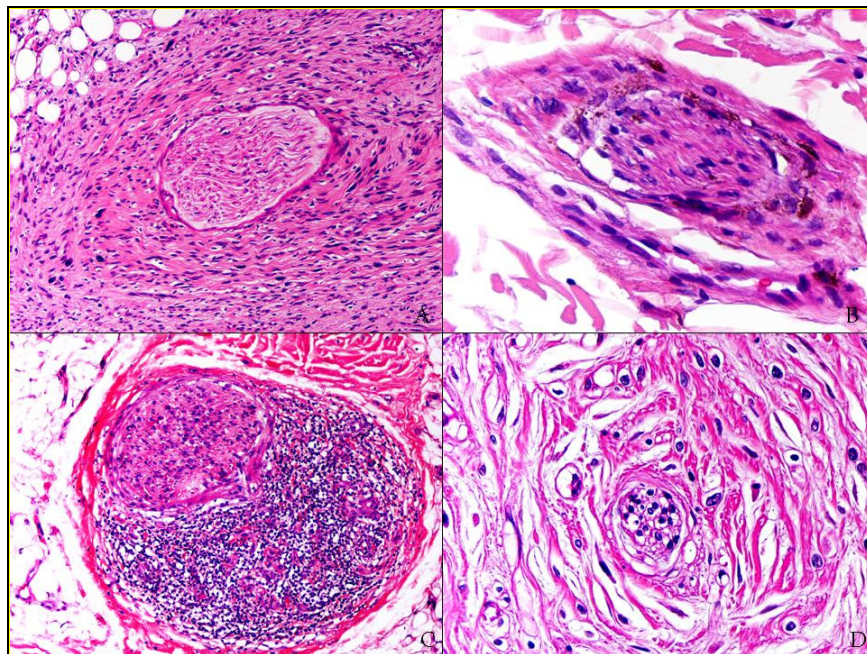


**Figura 4.** Melanoma desmoplásico em H&E. A: Pequena ampliação de uma lesão que afecta difusamente toda a derme e atinge o tecido celular subcutâneo. B: A epiderme mostra certo grau de hiperplasia e não se observa componente melanocítico juncional, nem intraepidérmico. C: A lesão é constituída por feixes de células fusiformes. D: Entre as células neoplásicas observa-se marcada desmoplasia do estroma.

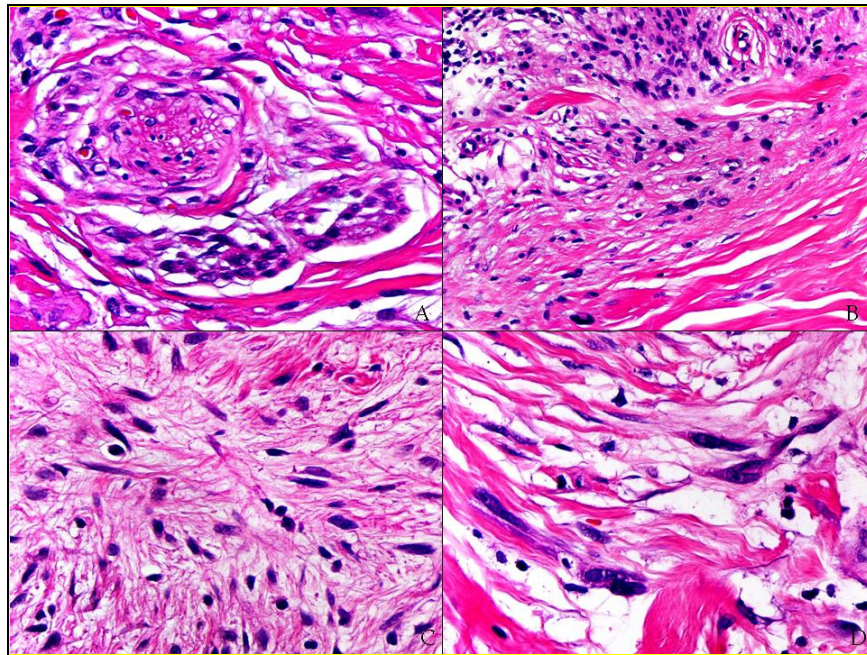
## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO



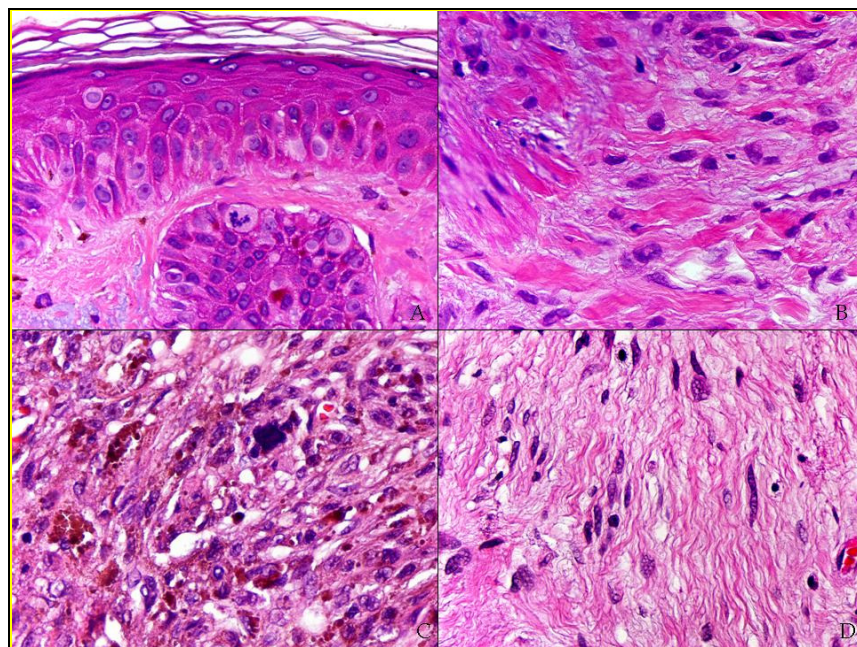
**Figura 5.** Diferentes padrões de comprometimento intraepidérmico em MMD, apesar de todos eles se caracterizarem pelo predomínio de melanócitos isolados sobre tecas de melanócitos. A e B: Padrão de lêntigo maligno. C: Padrão de melanoma maligno de extensão superficial *in situ*. D: Padrão de melanoma maligno acrolentiginoso *in situ*.



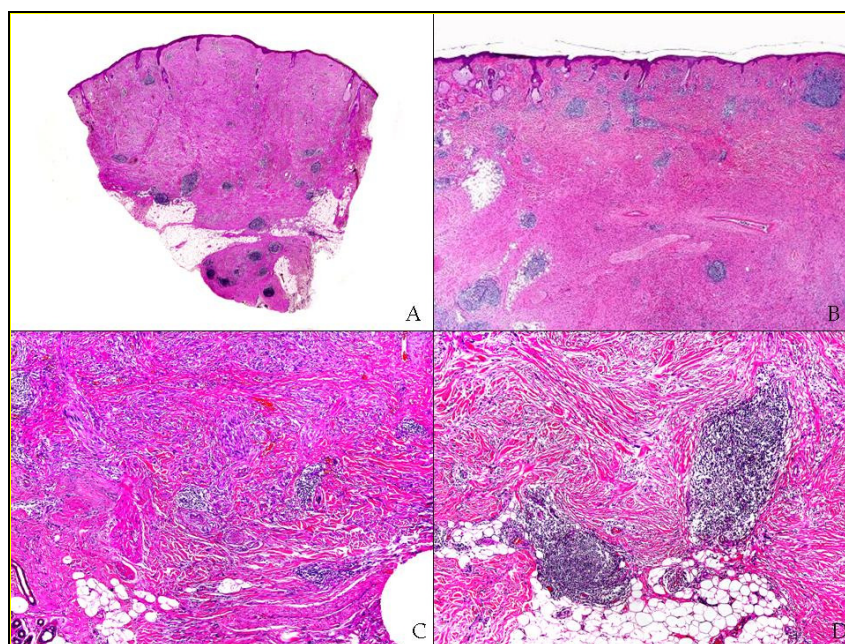
**Figura 6.** Diferentes padrões de infiltração neural em MMD. A: Perineural. B: Intraneural. C: Com infiltrado linfocitário denso perineural. D: Perineural em “casca de cebola”.



**Figura 7.** Diferentes tipos citológicos observados no MMD. A: Em ninhos de células redondas que dão à lesão uma aparência nevóide. B: Núcleos ligeiramente hiper cromáticos. C: Células fusiformes de núcleo pequeno e com escassa atipia. D: Núcleos maiores e pleomórficos.



**Figura 8.** As figuras de mitose podem ser observadas nos melanócitos neoplásicos de MMD, tanto no componente intraepitelial (A), como no componente intradérmico (B, C e D).



**Figura 9.** MMD com abundantes agregados linfóides. A. Pequena ampliação mostrando uma lesão que infiltra difusamente toda a derme e atinge o tecido celular subcutâneo. Os agregados linfóides são mais abundantes nas áreas profundas da neoplasia. B: Também se observam agregados linfóides salpicando o componente dérmico do tumor. C: Nas áreas profundas do tumor é mais evidente a desmoplasia da lesão. D: Detalhe dos agregados linfóides na união dermo-hipodérmica.

Todos os resultados histopatológicos são apresentados em valores totais referentes aos 113 casos de MMD. Dentro de parêntesis, mostramos o número de MMD “puros” / “mistos ou combinados” (51/62) ou a sua percentagem relativa (45%/55%). Cinquenta e um casos foram classificados como MMD puros quando a desmoplasia ocupava uma área superior a 90% do tumor, enquanto 62 casos foram denominados MMD mistos (combinados) quando co-existiam áreas de MM convencional com focos de desmoplasia no tumor. Os resultados da observação histopatológica sintetizam-se no Quadro 17.

Pela histopatologia demonstrou-se que a maioria das neoplasias era mal delimitada, envolvia toda a espessura da derme e atingia o tecido celular subcutâneo (Figura 4). A porção central do tumor era constituída por feixes mal definidos, de células fusiformes (ver pormenores adiante), que obliteravam e destruíam as estruturas preexistentes na derme e invadiam os tecidos vizinhos.

ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E ESTATÍSTICO

Quadro 17. Resultados histológicos dos 113 doentes com MMD

		MELANOMA DESMOPLÁSICO (MMD)		
		PURO	MISTO	TOTAL
1. Desmoplasia		(n=51)	(n=62)	(n=113)
2. MM <i>in situ</i>		41(80%)	50 (81%)	91 (81%)
3. Envolvimento folicular	Presente	11 (22%)	23 (37%)	34 (30%)
	Destruição folicular	17 (33%)	14 (23%)	31 (27%)
	Ausente	23 (45%)	25 (40%)	48 (43%)
4. Elastose solar		40 (78%)	53 (85%)	93 (82%)
5. Ulceração		5 (10%)	9 (15%)	14 (12%)
6. Breslow (mm)	<1	1 (2%)	1 (2%)	2 (2%)
	1 - <4	21 (41%)	33 (53%)	54 (48%)
	≥ 4	29 (57%)	28 (45%)	57 (50%)
	Espessura média	4.6	3.7	4.1
	Mediana	4.0	3.0	4.0
7. Nível de Clark	II- III	2 (4%)	3 (5%)	5 (4%)
	IV-V	49 (96%)	59 (95%)	108 (96%)
8. Envolvimento neural		19 (37%)	21 (34%)	40 (35%)
9. Invasão vascular		0	1 (2%)	1 (1%)
10. Padrão celular dos melanócitos (misto)				
Forma da célula	Fusiforme	42	54	96
	Epitelióide	9	12	21
	CMN*	3	5	8
Forma do núcleo	Vesiculoso pleomórfico	36	48	84
	Hipercromático	20	20	40
	Atípico	2	4	6
11. NMC (Mitoses/mm <sup>2</sup> )	< 1	34 (67%)	47 (76%)	81 (72%)
	1-4	16 (31%)	10 (16%)	26 (23%)
	> 4	1 (2%)	5 (8%)	6 (5%)
12. Pigmento	Abundante	1 (2%)	6 (10%)	7 (6%)
	Escasso	9 (18%)	17 (27%)	26 (23%)
	Ausente	41 (80%)	39 (63%)	80 (71%)
13. Agregados linfóides		27 (53%)	15 (24%)	42 (37%)
14. Infiltrado inflamatório	Superficial	23 (45%)	24 (39%)	47 (42%)
	Superficial e profundo	9(18%)	14 (23%)	23 (20%)
	Ausente	19(37%)	24 (39%)	43 (38%)
15. Regressão		3 (6%)	6 (10%)	9 (8%)
16. Espessura da epiderme	Atrófica	17 (33%)	27 (44%)	44 (39%)
	Normal	24 (47%)	28 (45%)	52 (46%)
	Hipertrófica	9 (18%)	7 (11%)	16 (14%)
	Ausência de epiderme	1 (2%)	0	1 (1%)
17. Faixa de Grenz		19 (37%)	27 (44%)	46 (41%)
18. Nevo associado		1 (2%)	3 (5%)	4 (4%)
19. Mucina		10 (20%)	13 (21%)	23 (20%)
20. Metaplasia óssea ou cartilaginosa		0	0	0

CMN, células multinucleadas; NMC, número de mitoses por mm<sup>2</sup>.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

Em 91 casos (41/50) observou-se um componente melanocítico intraepitelial (MM *in situ*), enquanto em 22 casos (10/12) apesar da realização de múltiplos cortes, no momento do primeiro diagnóstico, foi impossível demonstrar a presença de componente *in situ*. Dos 91 casos com componente melanocítico intraepitelial (Figura 5), 56 (26/30) revelaram imagens de lêntigo maligno, 13 (7/6) mostraram um padrão de MM tipo superficial, 3 (1/2) um padrão de MM acrolentiginoso e nos restantes 19 casos (7/12) não foi possível individualizar nenhum padrão específico de MM *in situ*, apesar de se observar uma proliferação de melanócitos isolados ao longo da junção dermo-epidérmica, com localização focal nas camadas superiores da epiderme.

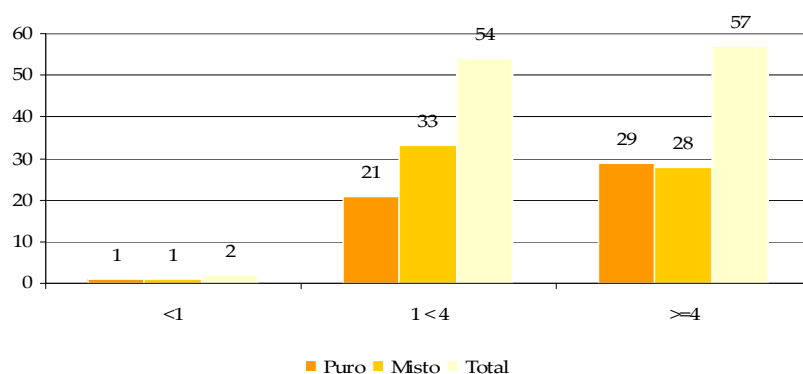
Foi observado envolvimento folicular em 65 casos (28/37), havendo concomitante envolvimento epitelial em 34 casos (11/23). Em 31 (7/14) dos casos, o envolvimento folicular resultou em destruição dos folículos pilosos.

Elastose solar, de intensidade variável, foi observada em 93 casos (40/53), ocorrendo a maioria destes tumores no couro cabeludo e face.

Ulceração da epiderme que revestia o tumor só foi observada em 14 casos (5/9).

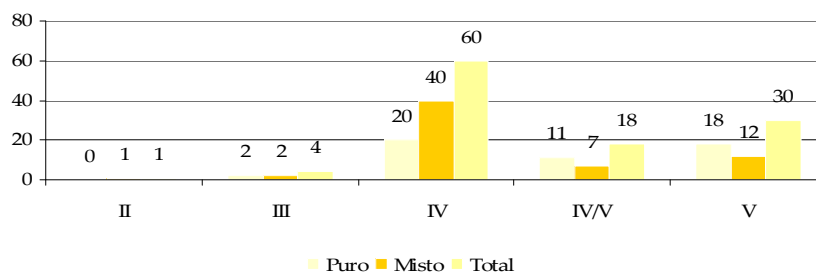
A espessura média dos tumores foi de 4.1 mm (4.6/3.7), com uma mediana de 4.0 mm (4.0/3.0) e o Breslow variou entre 0.3 e 11.0 mm. Em cinquenta e sete casos (29/28) a espessura tumoral foi superior a 4.0 mm conforme representação no Gráfico 5.

Gráfico 5. MMD Breslow (mm)



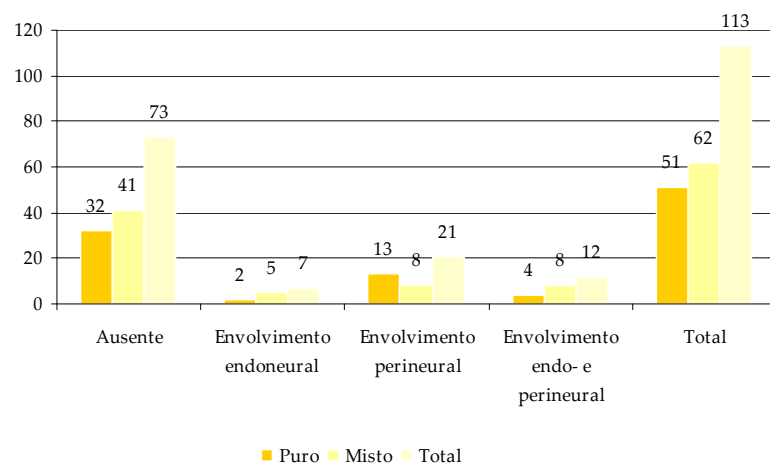
Só em 5 casos (2/3) se observou um nível de Clark inferior a IV, conforme o Gráfico 6.

**Gráfico 6. MMD: níveis de Clark**



Envolvimento neural foi observado em 40 casos (19/21) (Figura 6). Endoneural em 7 casos (2/5), perineural em 21 casos (13/8) e nos restantes 12 casos (4/8) o envolvimento neural foi simultaneamente endo – e perineural conforme Gráfico 7.

**Gráfico 7. MMD: envolvimento neural**



O envolvimento perineural foi encontrado principalmente nas áreas profundas da neoplasia e foi possível evidenciar uma correlação significativa entre a presença de neurotropismo e a espessura tumoral (Quadro 18).

Quadro 18. Correlação entre o envolvimento neural e o nível de Breslow no MMD

Envolvimento neural	MMD PURO (n=51)			MMD MISTO (n=62)		
	Média mm (variação)	Mediana mm	Desvio padrão	Média mm (variação)	Mediana mm	Desvio padrão
Presente (n=40)	5.39 (1.8-11)	5.0	2.502	4.8 (1.5-10)	4.0	2.388
Ausente (n=73)	4.11 (0.6-11)	3.6	2.258	3.2 (0.3-11)	2.5	2.266

Só num caso (0/1) se evidenciou envolvimento vascular, com presença de células neoplásicas dentro do lúmen vascular na profundidade da lesão tumoral.

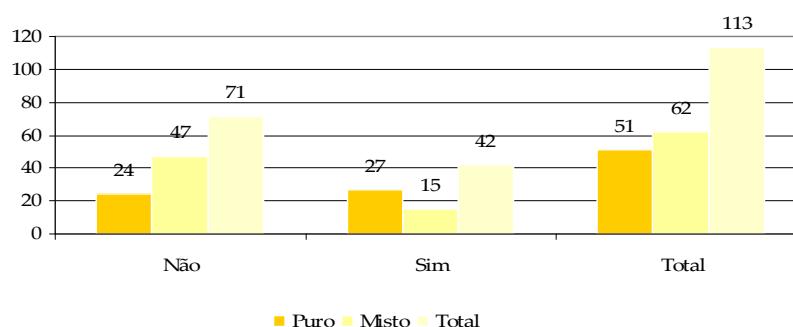
O padrão celular dos MMD foi misto (Figura 7) mas a forma celular mais frequente foi a fusiforme, em 96 casos (42/54), enquanto que a forma celular epitelióide predominou em 17 casos (9/8). Só em 8 casos foram observados melanócitos multinucleados dentro dos agregados neoplásicos. Núcleos vesiculosos pleomórficos foram observados em 84 casos (36/48) e em 40 casos (20/20) evidenciaram-se melanócitos com núcleos hiper cromáticos, mas só em 6 destes casos (2/4) os núcleos eram acentuadamente atípicos.

O número de mitoses das células neoplásicas (Figura 8) foi baixo ( $<1$  mitose/ $\text{mm}^2$ ) em 81 casos (34 MMD puros/47 MMD mistos), intermédio (1-4 mitoses/ $\text{mm}^2$ ) em 26 casos (16/10) e alto ( $>4$  mitoses/ $\text{mm}^2$ ) em 6 casos (1/5).

Oitenta MMD eram histologicamente amelanóticos (41/39), observando-se pequena quantidade de pigmento em 26 casos (9/17) e só 7 lesões (1/6) eram fortemente pigmentadas.

Agregados linfóides (Figura 9) estavam presentes dentro e em redor da neoplasia em 42 casos (27/15), conforme representação no Gráfico 8.

Gráfico 8. Presença de agregados linfóides em MMD



## ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E ESTATÍSTICO

Além dos agregados linfóides, um infiltrado inflamatório constituído predominantemente por linfócitos, com padrão em redor do plexo vascular dérmico superficial foi observado em 47 casos (23/24) e em 23 (9/14) dispunha-se com padrão perivascular superficial e profundo. Em 43 casos (19/24) não se observou qualquer inflamação linfocitária intradérmica.

Regressão focal foi detectada só em 9 casos (3/6) e envolvia apenas a derme superficial.

A epiderme que recobria a neoplasia tinha uma espessura normal para a localização em 52 casos (24/28), estava atrófica em 44 (17/27) e hipertrófica em 16 (9/7). Num dos casos observados a peça não continha epiderme.

Uma área poupada de derme superficial, a chamada faixa de Grenz, estava presente em 46 casos (19/27). Em dois (1/1) a epiderme aparecia destacada da derme subjacente, mimetizando uma bolha sub-epidérmica.

Um nevo intradérmico associado, maioritariamente localizado numa das margens laterais da peça excisada e sem evidência de transição do nevo melanocítico para o MMD, foi observado em 4 casos (1/3).

Em noventa casos não se detectou presença de mucina no estroma (41/49), enquanto uma pequena quantidade de mucina depositada, intersticialmente, entre as fibras de colagénio do MMD, foi detectada em 10 casos (7/3). Em 13 casos (3/10) a quantidade de mucina era grande conferindo ao estroma um aspecto mixóide, que mimetizava uma neoplasia do nervo periférico, tipo neurofibroma.

Não se observou metaplasia óssea ou cartilágnea em qualquer das peças por nós estudadas.

### 5.3.3. Imuno-histoquímicos

Como indicado em Material e métodos, o estudo imuno-histoquímico incidiu num subgrupo de 15 doentes, da nossa série total de 113 MMD, seleccionados entre os casos mais recentes com fragmentos de maior dimensão, para permitir múltiplos cortes para estudo. No Quadro 19 indicam-se as características clínico-patológicas dos doentes seleccionados.

MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

**Quadro 19. Características clínico-patológicas dos doentes seleccionados para estudo imuno-histoquímico**

	Caso nº	Sexo	Idade (anos)	Localização	Puro (P) / Misto(M)	Breslow (mm)	Envolvimento Neural (S/N)	Pigmento microscópico	Vivo(V)/ Morto(M)
1	76	M	81	Cabeça	P	5	N	N	V
2	78	F	72	Cabeça	P	6	S	N	V
3	83	F	82	Cabeça	P	6	S	N	V
4	84	F	46	Tronco	P	11	N	N	V
5	87	M	75	Extremidade	M	1,75	N	S	V
6	88	M	79	ND	P	4,7	S	S	V
7	92	F	65	Tronco	P	4	N	N	V
8	94	M	71	Tronco	M	7	N	S	M
9	95	M	84	Cabeça	P	6	S	S	ND
10	98	M	66	Cabeça	M	10	S	N	V
11	99	M	86	Cabeça	P	6	N	N	V
12	102	F	49	Cabeça	P	8	S	S	V
13	103	M	85	Cabeça	M	5	S	N	V
14	104	M	76	Tronco	P	5,5	S	N	V
15	110	M	88	ND	P	9	S	N	V

S, sim; N, não; ND, não disponível.

Os doentes estudados nesta série foram 10 do sexo masculino e 5 do sexo feminino, com uma idade média de 73,7 anos e mediana de 76 anos. O doente mais jovem tinha 46 anos de idade e o mais velho 88 anos. Os MM estavam localizados 8 na cabeça (53%), 4 no tronco (27%), 1 (7%) numa extremidade e em 2 casos não nos foi possível obter a sua localização anatómica. A espessura média dos MMD estudados foi de 6,33 mm, com uma mediana de 6,0 mm, variando entre uma espessura mínima de 1,75 mm e uma máxima de 11 mm. A invasão neural foi observada em 9 dos 15 casos estudados (60%). Quanto ao grau de desmoplasia registado, 73% foram classificados como variantes puras de MMD (11/15), enquanto 27% como variantes combinadas (4/15). Histologicamente, 67% dos MM eram amelanóticos (10/15). Da informação recolhida das consultas de seguimento só um dos 15 doentes faleceu por causas relacionadas com o MM (metástases pulmonares), estando ainda vivos 13 dos 15 doentes que se mantêm em consultas de seguimento (um dos doentes abandonou a consulta).

## ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E ESTATÍSTICO

Separámos os marcadores imuno-histoquímicos em três grupos: de diferenciação melanocítica, de progressão e sinalização tumoral e de células do estroma e os resultados apresentam-se em Quadros onde 0, +, ++ e +++ correspondem a marcação semi-quantitativa das células tumorais como atrás descrito. ND significa resultado “não disponível”.

**Quadro 20. Marcadores de diferenciação melanocítica**

	Caso nº	S100	HMB-45	Melan-A	TYR	MITF	CD117	P75
1	76	+++	0	0	0	0	0	+++
2	78	++	++	+++	+	+++	0	0
3	83	+++	0	0	0	0	0	+++
4	84	+++	0	0	0	0	0	ND
5	87	+++	+++	+++	0	+++	0	0
6	88	+++	0	0	0	0	0	+++
7	92	+++	0	0	0	0	0	++
8	94	+++	0	0	0	0	0	+++
9	95	+++	0	0	0	0	0	+++
10	98	+++	0	0	0	0	0	+++
11	99	+++	0	0	0	0	0	+
12	102	+++	0	0	0	0	0	+++
13	103	+++	0	0	0	0	0	+++
14	104	+++	0	0	0	0	0	+++
15	110	+++	0	0	0	0	0	+++
12*	102*	++	+	++	++	++	+	0

\* Representa a marcação de nevo associado ao MMD do caso 102, que não foi incluído no total final.

ND – Não disponível

Os **marcadores de diferenciação melanocítica** foram realizados todos nos 15 casos estudados, com excepção do caso 4 em que não se realizou a marcação com P75. Incluímos também os resultados da expressão destes marcadores nos melanócitos de um nevo associado a MM, no caso n.º 102 (Quadro 20).

No Quadro 21 discriminamos a expressão por marcadores.

**Quadro 21. Totais de marcação para cada marcador melanocítico isolado**

MARCAÇÃO	S100	HMB-45	MELAN-A	TYR	MITF	CD117	P75
0	0	13	13	14	13	15	2
+	0	0	0	1	0	0	1
++	1	1	0	0	0	0	1
+++	14	1	2	0	2	0	10
ND	0	0	0	0	0	0	1
<b>Total</b>	15	15	15	15	15	15	15

ND, não disponível.

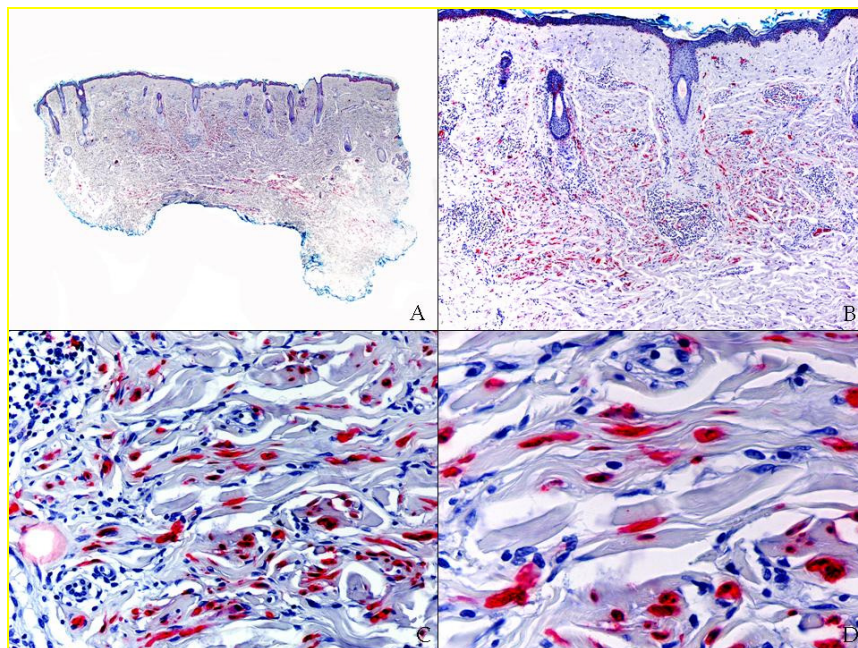
Todos os tumores foram fortemente positivos para a proteína S100 (Figura 10). Esta característica foi usada por nós como um dos critérios para o seu diagnóstico.

Quanto aos marcadores específicos de linhagem melanocítica, como Melan-A (Figura 11), HMB-45 e MITF (Figura 12), só foram positivos em 2 dos 15 casos, ou seja em 13%. Estes 2 doentes em que houve marcação foram os mesmos para os 3 marcadores. Nestes dois casos era notória a marcação de células malignas epitelióides.

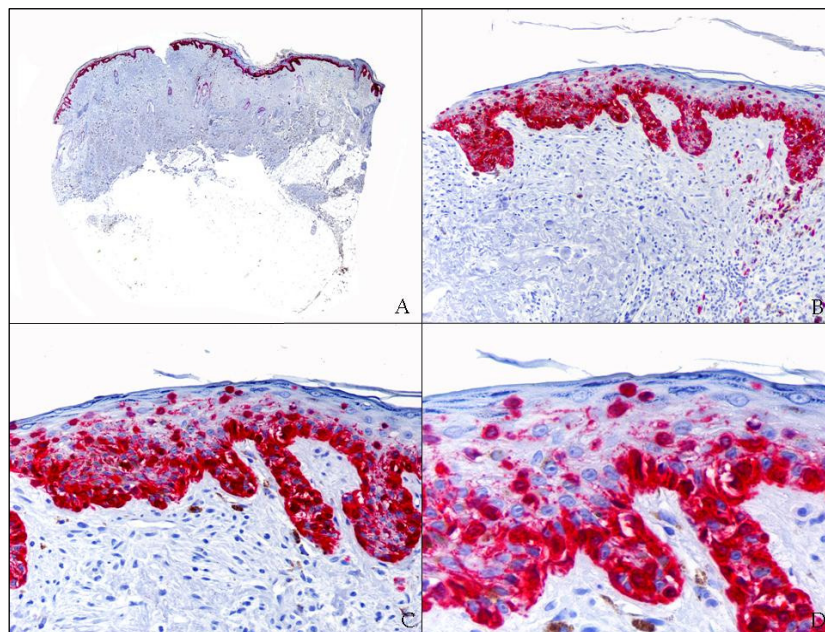
A marcação por P75 (Figura 13) foi fortemente positiva em 10 de 14 casos de MMD tendo sido muito útil na delimitação dos limites do tumor. A marcação foi negativa em dois dos casos estudados.

Por último o marcador C-KIT (Figura 14) foi negativo para células tumorais em todos os casos, tendo sido positivo para mastócitos, observados em número significativamente aumentado em 7 dos 15 casos, o que correspondeu a 47% do total de casos estudados.

O caso 102 continha um nevo melanocítico intradérmico à periferia do tumor cujas células expressavam marcação nuclear e citoplasmática para S100, marcação nuclear moderada para MITF, marcação citoplasmática moderada para Melan-A e tirosinase, expressando apenas focalmente HMB-45 no citoplasma das células névicas do componente dérmico superficial. O MMD deste caso, como vimos atrás, expressava S100 e P75, mas era negativo para a totalidade dos outros marcadores de diferenciação melanocítica.

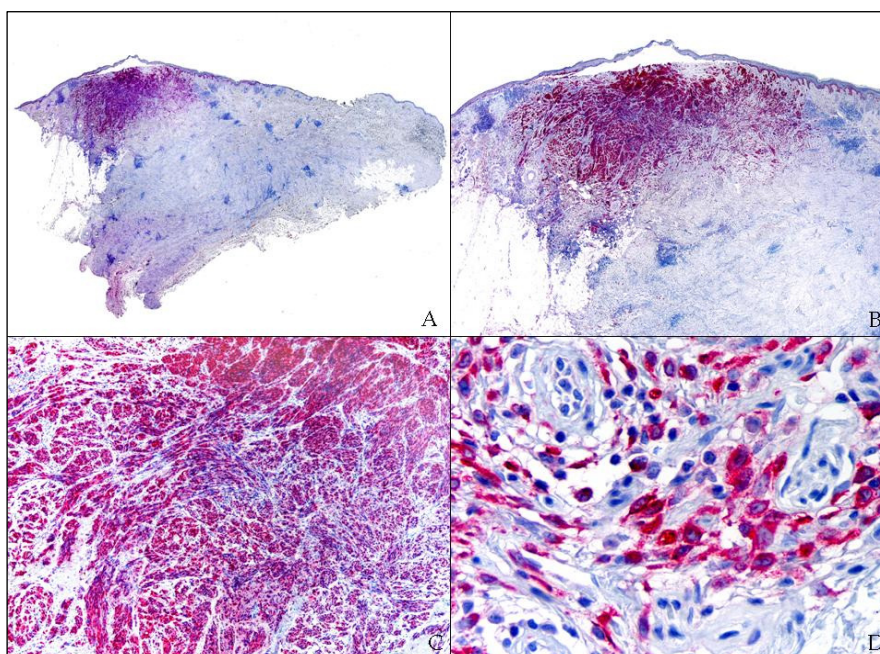


**Figura 10.** Imunomarcção para proteína S-100 de um MMD. A: Pequena ampliação mostrando células isoladas com expressão de proteína S-100 em toda a espessura da neoplasia. B: Em maior aumento, observa-se o escasso componente juncional S-100 positivo e a positividade de muitas das células do componente dérmico. C: A maioria das células fusiformes, imersas no estroma desmoplásico, expressa proteína S-100. D: A imunomarcção da proteína S-100 pode ser observada tanto no núcleo, como no citoplasma das células neoplásicas.

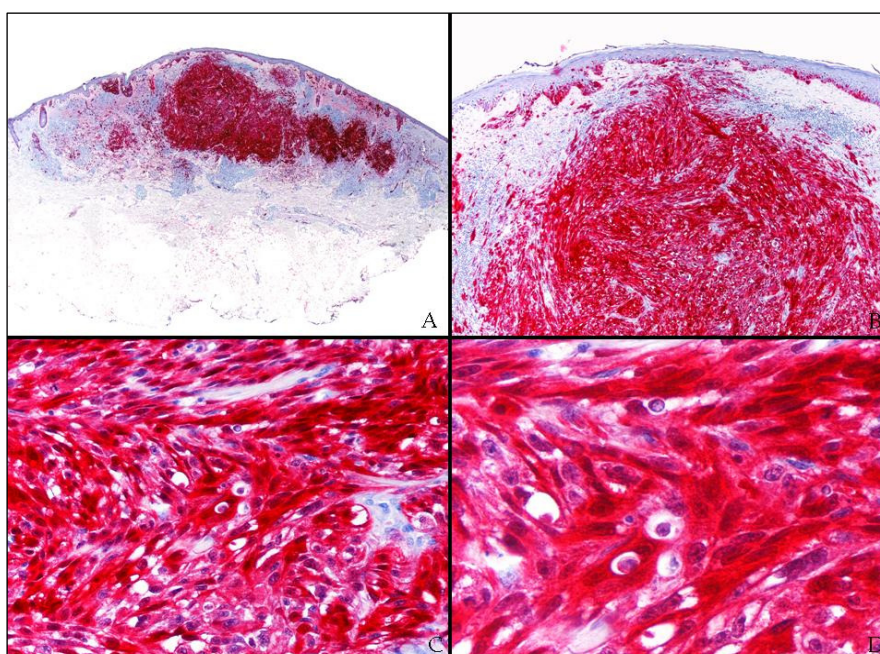


**Figura 11.** Imunomarcção para Melan-A de um MMD. A: Pequena ampliação mostrando positividade apenas no componente intraepidérmico e negatividade na quase totalidade do componente dérmico. B: Em maior ampliação observa-se que só algumas das células neoplásicas isoladas, localizadas na derme superficial, expressam Melan-A. C: Intensa positividade para o Melan-A do componente intraepidérmico da neoplasia. D: A expressão de Melan A no componente intraepidérmico observa-se tanto em células neoplásicas dispostas ao longo da união dermo-epidérmica como em células isoladas dispersas nas camadas altas da epiderme.

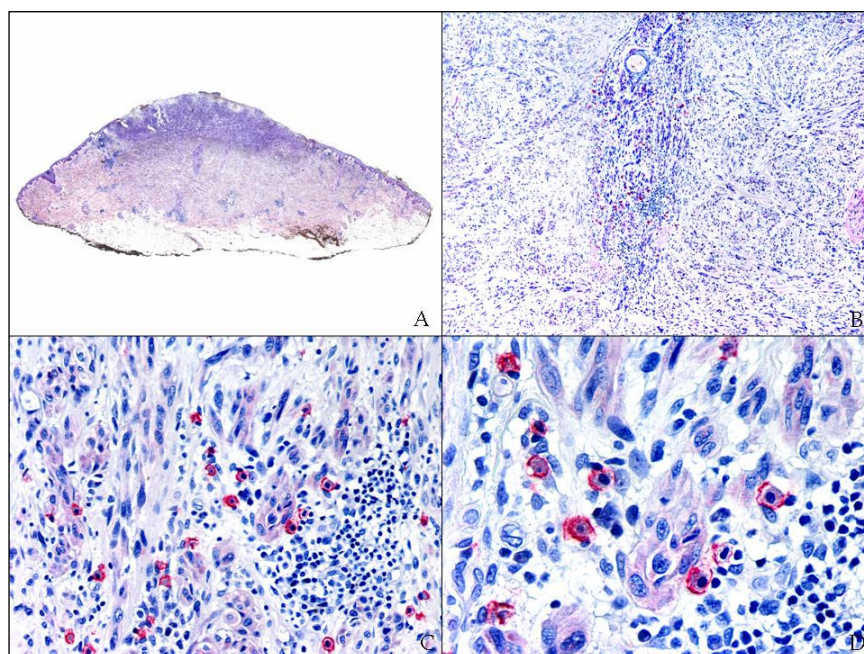
## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO



**Figura 12.** Imunomarcção para MITF de um MMD. A: Pequena ampliação mostrando que as células neoplásicas fusiformes do componente dérmico são positivas na metade esquerda do tumor. A maioria das células neoplásicas localizadas na metade direita do tumor incluindo as que salpicam os numerosos agregados linfóides, não expressam MITF. B: A positividade das células neoplásicas para MITF observa-se em toda a espessura do componente intradérmico. C: Nestas áreas predominam os feixes de células fusiformes MITF positivas, com escasso estroma desmoplásico a separá-los. D: Em maior ampliação observa-se que a positividade para MITF se localiza no núcleo das células neoplásicas.



**Figura 13.** Imunomarcção para P75 de um MMD. A: Pequena ampliação mostrando intensa imunoposição de P75 nos componentes intraepidérmico e dérmico da neoplasia. B: O componente intraepidérmico da neoplasia, que expressa P75, localiza-se preferencialmente ao longo da camada basal da epiderme. C: Intensa positividade para P75 nas células neoplásicas do componente intradérmico. D: Em maior ampliação observa-se o pleomorfismo nuclear das células neoplásicas, assim como a sua morfologia fusiforme ou ovalada dependendo do plano de corte.



**Figura 14.** Imunomarcção para C-KIT de um MMD. A: Pequena ampliação mostrando que a neoplasia é negativa para C-KIT em toda a sua espessura. B: Em maior aumento adivinha-se que algumas células isoladas, salpicadas pela neoplasia, expressam C-KIT. C: Estas células C-KIT positivas são mais redondas e com citoplasma mais vasto que os melanócitos neoplásicos, que exibem uma morfologia fusiforme com citoplasma escasso. D: Em maior ampliação comprova-se que as células C-KIT positivas são mastócitos dispersos na lesão tumoral.

Nos resultados dos **marcadores de progressão e sinalização tumoral** incluímos os referentes à pesquisa da **mutação V600E no gene BRAF** apesar desta ter sido testada por PCR e não por imuno-histoquímica.

Com a exceção do caso 4 em que não dispomos de alguns marcadores, assim como, a marcação por P21 do caso 15, expomos todos os restantes resultados no Quadro 22.

MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

**Quadro 22. Marcadores de progressão e sinalização tumoral**

	Caso nº	Ki-67	MPM-2	CyD1	CDK2	CDK4	RB	P16	P19	P21	P27	PTEN	BRAF
1	76	+	0	+	0	0	++	0	0	0	0	+	0
2	78	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+	+	+	0
3	83	+	0	++	+	0	+++	0	0	+	++	0	0
4	84	ND	0	ND	0	0	++	ND	ND	ND	++	+	0
5	87	0	0	++	+++	0	+++	+++	0	0	0	0	0
6	88	++	0	+++	+	0	+	+++	0	+	++	0	0
7	92	+	0	++	0	0	+	+++	0	0	++	0	0
8	94	++	+	+	+	0	+++	0	0	0	0	0	0
9	95	+	0	++	++	0	++	0	0	0	0	++	0
10	98	++	0	+	0	0	+++	+++	0	0	0	+++	0
11	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	0
12	102	0	0	0	0	0	0	+++	0	0	+	0	0
13	103	++	0	++	++	0	+++	+	0	+	0	++	0
14	104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	0	0
15	110	0	0	++	+	0	0	++	0	ND	+	0	0
12*	102*	0	0	0	++	0	0	+	0	0	0	++	0

\* Representa a marcação de nevo associado ao MMD do caso 102, que não foi incluído no total final.

No Quadro 23 são apresentados os resultados relativos a cada marcador.

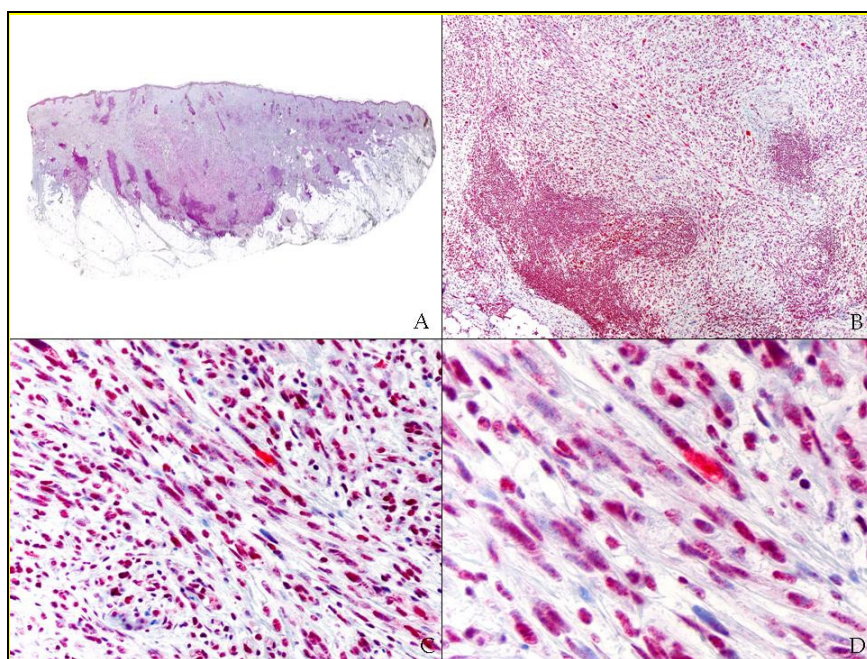
**Quadro 23. Totais de marcadores isolados de progressão e sinalização tumoral**

Marcação	Ki-67	MPM-2	CyD1	CDK2	CDK4	RB	P16	P19	P21	P27	PTEN	BRAF
0	5	13	3	7	14	4	6	14	9	7	8	15
+	4	1	3	4	0	2	1	0	4	3	3	0
++	4	0	6	2	0	3	1	0	0	5	2	0
+++	1	1	2	2	1	6	6	0	0	0	2	0
ND	1	0	1	0	0	0	1	1	2	0	0	0
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

## ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E ESTATÍSTICO

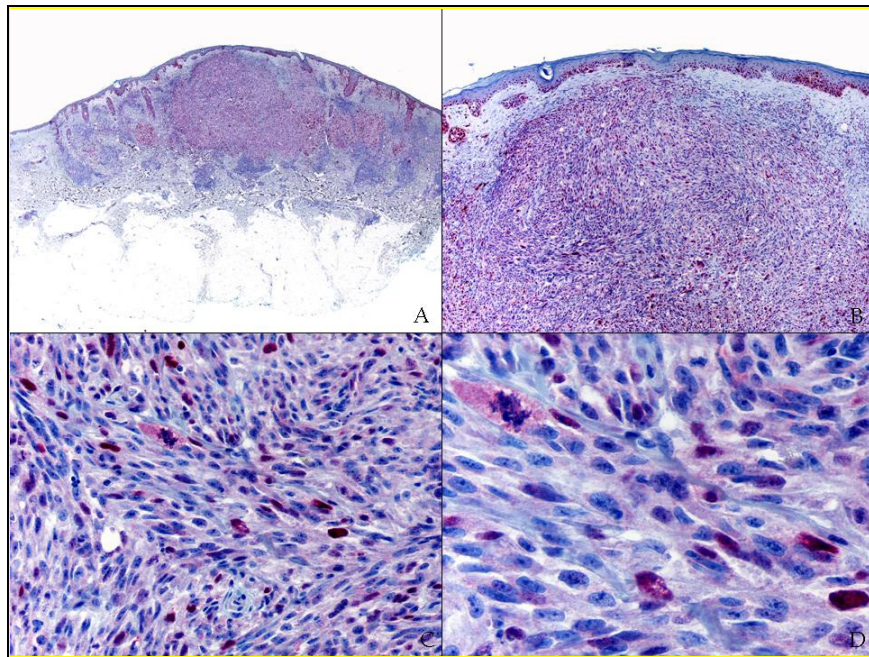
A marcação com o anticorpo MPM-2 foi negativa em 13 dos 15 casos estudados (Figura 15) e o anticorpo Ki-67 marcou mais de 5% do total das células tumorais em 9 dos 14 casos testados. Ciclina D1 foi positiva em 11 dos 14 casos testados; CDK4 foi negativo em 14 dos 15 casos testados. P16 foi positivo em 8 de 14 casos testados enquanto que os outros inibidores de CDK como P19, P21 e P27 foram negativos em mais de 50% dos casos testados (Figuras 16 e 17). Retinoblastoma foi negativo em 4 dos 15 casos testados e fortemente positivo em 6 dos 11 casos positivos (Figura 18). PTEN foi expresso em 7 dos 15 casos testados. A mutação do BRAF, testada por PCR nos 15 casos estudados, nunca foi detectada.

O nevo melanocítico intradérmico associado ao MMD no caso 102 foi negativo para o marcador de mitoses MPM-2, para o marcador de proliferação celular Ki-67 e para todos os marcadores de sinalização celular, à exceção da CDK2 e dos supressores P16 e PTEN.

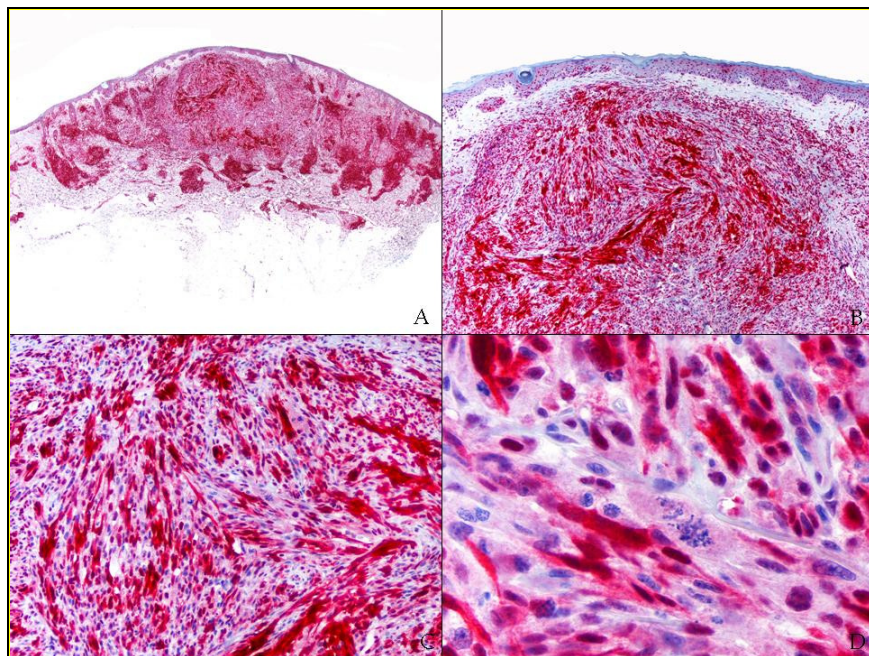


**Figura 15.** Imunomarcção para MPM-2 de um MMD. A: Em pequena ampliação observa-se escassa expressão deste marcador em toda a espessura da neoplasia. B: A expressão máxima deste marcador é observada nas células dos agregados linfóides, enquanto que a grande maioria dos melanócitos neoplásicos são negativos. C: Em maior aumento, comprova-se que a maioria dos melanócitos neoplásicos não expressam MPM-2, o que está de acordo com o baixo índice mitótico desta neoplasia. D: Só alguns núcleos isolados das células neoplásicas expressam MPM-2.

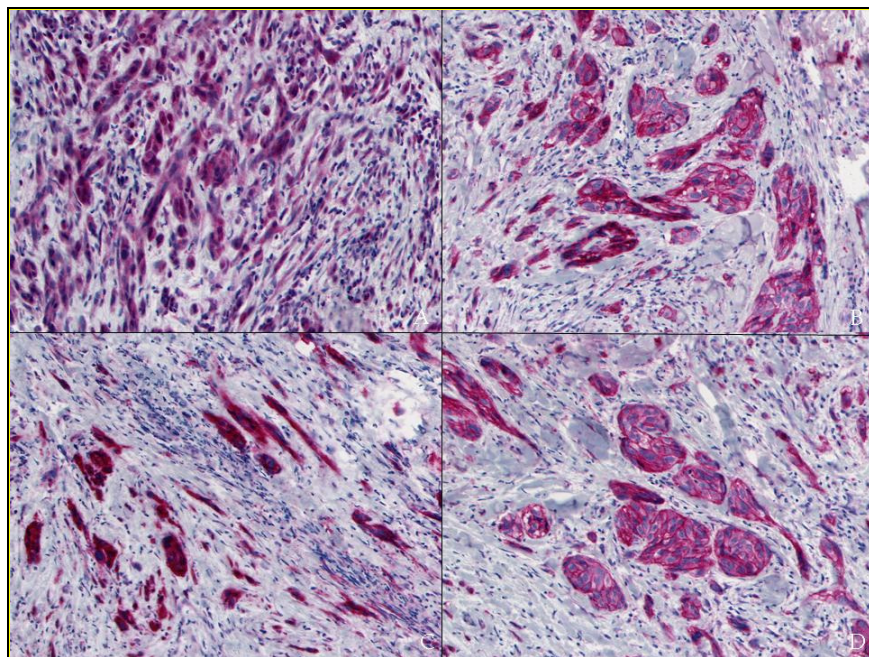
## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO



**Figura 16.** Imunomarcção para P21 num MMD. A: Pequena ampliação em que se observa escassa imunomarcção para este marcador na maioria das células neoplásicas. B: Em maior aumento, comprova-se que a expressão deste marcador é mais intensa no componente intraepidérmico e dérmico superficial da neoplasia. C: Algumas células isoladas dos feixes de células fusiformes expressam P21. D: Em maior aumento, comprova-se que a expressão de P21 é mais acentuada no núcleo de algumas células neoplásicas, que aparece pleomórfico e hipercrômico.



**Figura 17.** Imunomarcção para P27 num MMD. A: Pequena ampliação em que se observa intensa imunomarcção para P27 nas células neoplásicas. B: A positividade para o P27 observa-se tanto no componente intraepidérmico como no dérmico do tumor. C: Detalhe da intensa reactividade para P27 nas células fusiformes dos feixes intradérmicos da neoplasia. D: Detalhe da maior intensidade de imunomarcção para P27 nas células mais pleomórficas.



**Figura 18.** Imunomarcação para o gene de retinoblastoma num MMD. A positividade para este marcador é observada tanto nos feixes de células fusiformes (A e C) como nos ninhos de células mais arredondadas (B e D).

Os **marcadores de células do estroma** foram realizados todos nos 15 casos estudados, com exceção do caso 4 em que não se realizou a marcação com Fascina, CD34 e Claudina. Incluímos também os resultados da expressão destes marcadores nos melanócitos de um nevo associado a MMD, no caso n.º 102.

Os resultados obtidos com os anticorpos para os marcadores de células do estroma testados encontram-se esquematizados nos Quadros 24 e 25.

Quadro 24. Marcadores de células do estroma

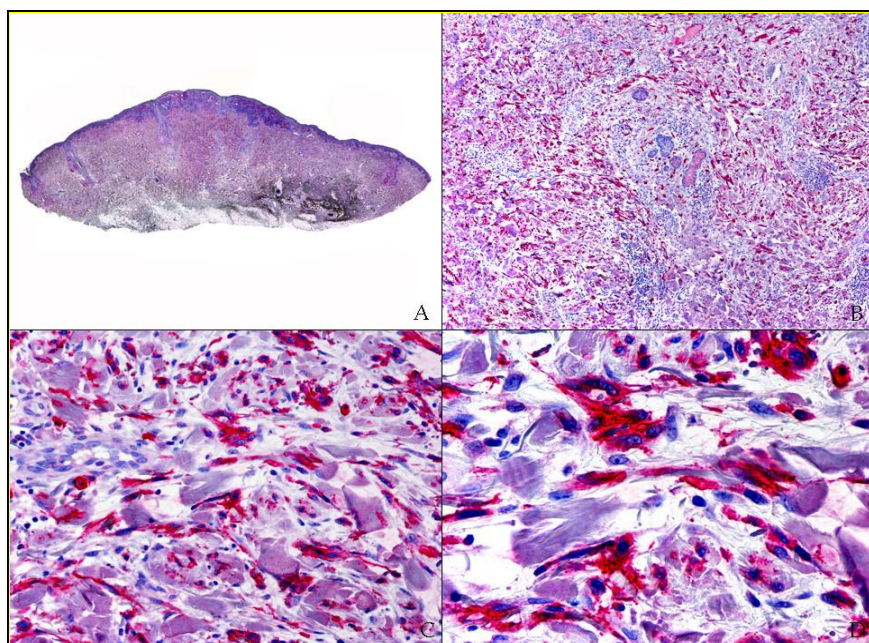
	Caso nº	N-Caderina	Fascina	CD13	AML	CD34	GLUT-1	Claudina
1	76	+++	0	0	0	0	0	0
2	78	0	0	0	0	0	0	0
3	83	+++	0	0	0	0	0	0
4	84	+	ND	0	0	ND	0	ND
5	87	+	0	0	0	0	0	0
6	88	+++	+++	0	0	0	0	0
7	92	0	+++	0	0	0	0	0
8	94	+++	0	0	++	0	0	0
9	95	+++	+++	0	0	0	0	0
10	98	+++	0	0	0	0	0	0
11	99	+	0	0	0	0	0	0
12	102	0	0	0	0	0	0	0
13	103	+++	++	0	0	0	0	+
14	104	0	0	0	0	0	0	0
15	110	++	0	++	0	0	0	0
12*	102*	++	0	0	0	0	0	0

\* Representa a marcação de nevo associado ao MMD do caso 102, que não foi incluído no total final.

A maioria dos marcadores foi negativa com exceção da N-caderina (Figura 19) expressa em 11 dos 15 casos testados, Fascina expressa em 4 de 14 MMD e CD13, AML (actina do músculo liso) e Claudina que foram positivos em um dos casos, cada. As células névicas, do caso 102, não expressaram qualquer marcador de diferenciação do estroma, com exceção da N-caderina.

Quadro 25. Totais parciais de marcadores de células do estroma

Marcação	N-Caderina	Fascina	CD13	AML	CD34	GLUT-1	Claudina
0	4	10	14	14	14	15	13
+	3	0	0	0	0	0	1
++	1	1	1	1	0	0	0
+++	7	3	0	0	0	0	0
ND	0	1	0	0	1	0	1
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>



**Figura 19.** Imunomarcção para N-caderina num MMD. A: Pequena ampliação em que se observa que a positividade para este marcador está circunscrita ao componente dérmico da neoplasia. B: A maior aumento, observa-se a expressão de N-caderina nas células de toda a espessura do componente dérmico da neoplasia. C. As células que expressam N-caderina possuem uma morfologia fusiforme. D: Detalhe da expressividade citoplasmática para N-caderina.

#### 5.3.4. Estatísticos

**Marcadores de diferenciação melanocítica** (S100, HMB-45, Melan-A, Tirosinase, MITF, CD117 e P75).

Quando se consideram estes marcadores como  $m = 7$  “juízes” a atribuir pontuações a  $I = 15$  itens (casos), e se substitui a magnitude das pontuações por *ranks* (há muitas pontuações empatadas, visto que são 0, 1, 2, 3, para 15 casos, e por isso passa-se a *ranks* médios ou ajustados).

Observa-se que o caso 5 é bastante distinto dos remanescentes e destaca-se dos outros por ter uma soma de *ranks* de 72 (enquanto os outros têm somas de cerca de 55, sendo o mínimo 47 no caso 4), conforme se demonstra no Quadro 26.

Quadro 26. Soma de *ranks* dos marcadores de diferenciação melanocítica

	Caso nº	S100	HMB-45	Melan-A	TIR	MITF	CD117	P75	Σ de <i>ranks</i>
1	76	8.5	7	7	8.5	7	8	10.5	56.5
2	78	1	14	14.5	1	14.5	8	3	56
3	83	8.5	7	7	8.5	7	8	10.5	56.5
4	84	8.5	7	7	8.5	7	8	1	47
5	87	8.5	15	14.5	8.5	14.5	8	3	72
6	88	8.5	7	7	8.5	7	8	10.5	56.5
7	92	8.5	7	7	8.5	7	8	5	51
8	94	8.5	7	7	8.5	7	8	10.5	56.5
9	95	8.5	7	7	8.5	7	8	10.5	56.5
10	98	8.5	7	7	8.5	7	8	10.5	56.5
11	99	8.5	7	7	8.5	7	8	3	49
12	102	8.5	7	7	8.5	7	8	10.5	56.5
13	103	8.5	7	7	8.5	7	8	10.5	56.5
14	104	8.5	7	7	8.5	7	8	10.5	56.5
15	110	8.5	7	7	8.5	7	8	10.5	56.5
		120	120	120	120	120	120	120	

Σ, somatório.

A estatística de Friedman,

$F = 12 \cdot \text{soma dos quadrados das somas dos ranks} / (m \cdot I \cdot (I+1)) - 3 \cdot m \cdot (I+1)$  tem sob a hipótese nula de aleatoriedade de atribuição das pontuações uma distribuição aproximada de qui-quadrado com  $I-1$  graus de liberdade (g.l.).

Neste caso o número de graus de liberdade é 14 e o valor observado da estatística de teste é 2.954 ( $p = 0.999$ ).

De facto, só o marcador P75 exhibe uma variabilidade que poderia ajudar a diferenciar os casos; e só proteína S100 parece ter uma sensibilidade que o torna eficiente.

Claro que se pode objectar que com tantos empates o valor do teste de Friedman é contestável.

Se excluirmos os casos em que há numerosos empates, o único marcador remanescente é P75 — não faz sentido fazer uma análise deste subgrupo com apenas um marcador.

## ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E ESTATÍSTICO

Por outro lado, a comparação dos marcadores mostra que S100 (critério diagnóstico) quase sempre marca fortemente qualquer um dos 15 casos e que CD117 não marca nenhum, conforme as somas de pontuações para cada marcador indicam:

Marcador	S100	HMB-45	Melan-A	TYR	MiTF	CD117	P75
Soma de marcador	44	5	6	1	6	0	33

E no fundo apenas P75 parece ter algum papel diferenciador. No entanto como não se tem uma avaliação independente para a sensibilidade dos 15 casos que foram seleccionados, esta observação no estado actual da investigação não permite tirar nenhuma conclusão estatística.

**Marcadores de progressão e sinalização tumoral** (Ki-67, MPM-2, Ciclina D1, CDK2, CDK4, RB, P16, P19, P21, P27, PTEN, BRAF).

As somas de pontuações de cada marcador indicam (de novo assumindo que os 15 casos correspondem a doentes com MMD) que RB é o marcador com maior sensibilidade, seguido de Ciclina D1 e P16; por outro lado P19 e BRAF parecem não ter qualquer capacidade discriminativa.

Ki-67	MPM-2	Ciclina D1	CDK2	CDK4	RB	P16	P19	P21	P27	PTEN	BRAF
15	4	21	14	3	26	21	0	4	13	13	0

É importante eliminar o caso 4 com resultados não disponíveis para muitos marcadores.

Desta vez o valor observado da estatística de Friedman é  $F = 20.551$ , a que corresponde  $p = 0.082$ .

Assim, ao nível  $\alpha = 0.05$ , o resultado da classificação dos casos pelos 7 marcadores (excluimos MPM-2, CDK4, P19, P21 e BRAF, visto terem uma soma de pontuações inferior a 5 nos 14 casos estudados) não se distingue de uma classificação ao acaso, pois não se rejeita a hipótese nula de aleatoriedade.

Atente-se nas pontuações ou nos *ranks* para se ver que o caso 2 se destaca como o mais forte e consistentemente marcado; os casos 11 e 14 são os que têm um *rank* global mais baixo.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

**Marcadores de células do estroma** (N-caderina, Fascina, CD13, AML, CD34, GLUT-1 e Claudina).

A soma de pontuações atribuídas por cada um dos marcadores (excluímos, mais uma vez, o caso 4) indica que apenas N-caderina e Fascina podem ser indicadores positivos com interesse.

N-caderina	Fascina	CD13	AML	CD34	GLUT-1	Claudina
25	11	2	2	0	0	1

Tratando este grupo como anteriormente, o valor observado da estatística de Friedman é 11.586, que corresponde com 13 g.l. a um  $p = 0.56$ .

### Discussão

A diversidade de variedades clínicas e histológicas de MM cutâneos primários parece estar associada a uma heterogeneidade não só fenotípica, como também genotípica, podendo o seu estudo vir a ter utilidade na separação de doentes com MM, em subgrupos distintos, permitindo no futuro individualizar não só o prognóstico, como o tratamento de MM.

Tal como em outras neoplasias, o processo de transformação de melanócitos normais em MM requer a aquisição de alterações no seu genoma. Apesar do progresso já realizado na pesquisa de alvos de aberração genética no cancro ter sido enorme em múltiplos aspectos, o efeito clínico deste trabalho é ainda limitado. Parece claro que estes estudos não são meramente académicos, pois está provado que são poderosas formas de aproximação à selecção de alvos e armas terapêuticas.<sup>40</sup>

Para se poder fazer um diagnóstico é necessário lembrarmo-nos da existência da entidade em causa. MMD descrito em 1971 por Conley e col.<sup>267</sup> associado ao neurotropismo descoberto em 1979 por Reed e col.<sup>268</sup> só se começa a diagnosticar regularmente e com fiabilidade na década de 80 do século passado, após a generalização do uso da proteína S100 como método de rotina nos estudos de imuno-histoquímica dos tumores,<sup>346</sup> nos laboratórios de Histopatologia cutânea.

O MMD contém vastas áreas de grossas fibras de colagénio na derme, entre as quais se encontram dispersos melanócitos tumorais, habitualmente fusiformes, não agrupadas em tecas, como é costume vermos no MM convencional. Em virtude de se tratar de um tumor indiferenciado, as células tumorais expressam apenas de maneira focal, ou são até totalmente negativas, para marcadores de diferenciação melanocítica clássicos como HMB-45, Melan-A, Tirosinase ou MITF. Sendo assim, são elementos de grande ajuda no diagnóstico histológico de MMD, a observação de atipia melanocítica na epiderme, aspectos de tropismo neural, assim

como a presença de pigmento melânico em tumor que expresse proteína S100 e seja simultaneamente negativo para outras linhagens celulares como epitelial (citoqueratina) e vascular (CD31 e CD34).

Mesmo presumindo estarmos em presença de uma neoplasia com origem melanocítica, como não é muito evidente o pleomorfismo e a atipia nuclear, assim como o escasso número de mitoses observadas, decidimos explorar o estudo dos marcadores de progressão e sinalização celular com o objectivo de evidenciar o carácter maligno da neoplasia.

Foi igualmente nosso objectivo perceber qual a origem do estroma e qual o seu eventual papel na patogénese oncológica.

Como último objectivo procurámos perceber qual a evolução clínica habitual neste tipo de tumores.

Na sequência do referido, cumpre comparar os resultados observados nos 113 doentes da nossa série com os resultados observados noutras séries já publicadas, começando pelos aspectos clínicos, histológicos e de imuno-histoquímica (incluímos aqui o estudo da mutação do gene *BRAF* efectuada por PCR) e concluindo com uma análise exploratória dos resultados estatísticos.

Com o objectivo de facilitar a leitura desta informação preparámos tabelas contendo todas as variáveis acima mencionadas (Quadro 27).

Segundo a literatura o MMD tende a ocorrer mais frequentemente em homens, habitualmente numa relação 2M/1F, ao contrário do MM clássico, que ocorre mais frequentemente no sexo feminino. A excepção pode observar-se nas séries publicadas por Egbert e col.<sup>334</sup> com 25 casos, por Wharton e col.<sup>347</sup> com 18 casos, assim como na de Rütten e col.<sup>283</sup> com 34 casos, em que os doentes do sexo masculino foram observados em percentagens de 44%, 44% e 34%, respectivamente. Na nossa série não houve praticamente diferenças em relação ao sexo (48%♂ / 52%♀) quando analisados os doentes com MMD no seu todo. Quando separados em 2 subgrupos, quanto ao grau de desmoplasia, encontramos no grupo dos MMD puros um ligeiro predomínio do sexo masculino (53%♂ / 47%♀) ao contrário do observado no subgrupo dos MMD mistos ou combinados (44%♂ / 56%♀).

## DISCUSSÃO

**Quadro 27. Características da apresentação clínica de MMD<sup>348</sup>**

<b>Autor</b>	<b>Doentes</b>	<b>Sexo Masculino (%)</b>	<b>Idade média (variação)</b>	<b>Localização (CPT/E)</b>	<b>Instituição</b>	<b>Ano de publicação</b>
Quinn <sup>280</sup>	280	64	61 (24-91)	39/24/37	Sidney UM	1998
Hawkins <sup>335</sup>	131	69	65 (ND)	50/23/27	Washington U	2005
Posther <sup>281</sup>	129	64	55 (18-90)	50/22/28	Duke	2006
Skelton <sup>282</sup>	128	66	63 (4-99)	50/16/34	AFWU e MSKCC	1995
Busam <sup>349</sup>	92	58	65 (11-92)	57/19/24	MSKCC	2005
Livestro <sup>303</sup>	89	63	64 (33-84)	66/14/20	MGH	2005
Arora <sup>350</sup>	65	68	65 (31-92)	56/18/26	U Michigan	2005
Pawlik <sup>340</sup>	65	57	61 (17-90)	20/30/50	MDACC	2006
Jaroszewski <sup>286</sup>	59	63	63 (31-91)	61/19/20	Mayo Clinic	2001
Smithers <sup>298</sup>	58	57	63 (17-89)	41/35/24	U Queensland	1990
Jain <sup>351</sup>	45	69	64 (42-91)	78/11/11	Q Elizabeth H	1989
Vongtama <sup>352</sup>	44	75	66 (35-87)	82/17/11	UCLA	2003
Rütten <sup>283</sup>	34	35	70 (50-92)	78/16/6	DPFr	1996
Payne <sup>353</sup>	30	70	63 (33-87)	40/33/27	U South Florida	2001
Egbert <sup>334</sup>	25	44	61(38-83)	86/4/12	UCSF	1988
Anstey <sup>354</sup>	25	56	65 (39-86)	72/12/16	SJDC-STH	1993
Wharton <sup>347</sup>	18	44	64 (30-87)	66/17/17	AMC, MGH	1999
Walsh <sup>299</sup>	14	71	58 (17-77)	28/36/36	HGH	1988
Weinzweig <sup>355</sup>	11	64	68 (48-81)	36/36/28	U Illinois	1995

CP: cabeça e pescoço; T: tronco; E: extremidades; AFWU: Armed Forces Washington University; AMC: American Medical Center; DPFR: Dermopath Friedrichshafen; HGH: Henderson General Hospital, Canada; HSM: Hospital de Santa Maria, Lisboa; MGH: Massachusetts General Hospital, Boston; MDACC: MD Anderson Cancer Center; MGH: Massachusetts General Hospital; MSKCC: Memorial Sloane-Kettering Cancer Center; SGDC-STH: St John's Dermatology Centre – St Thomas's Hospital, Londres; Sidney MU: Sidney Melanoma Unit; SUMD: Stanford University Medical Centre; UCLA: University of California-Los Angeles; UCSF: University of California-San Francisco

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

Os doentes da nossa série tinham à altura do diagnóstico uma idade média de 71 anos, que é cerca de dez anos superior, em média, às dos doentes das outras séries de MMD devido a maior longevidade no sexo feminino, conforme abaixo demonstrado:

	FEMININO		MASCULINO	
	Nº	%	Nº	%
<= 71 anos	25	42%	30	56%
> 71 anos	34	58%	24	44%
Total	59	100%	54	100%

A idade média de aparecimento de MMD na nossa série está muito acima dos números apontados para a idade média de aparecimento dos outros tipos convencionais de MM, que varia entre os 46 anos e os 53 anos, conforme os Países estudados.<sup>280,335</sup> Esta idade aproxima-se mais da idade de aparecimento do MM sobre lântigo.

Se analisarmos, na nossa série, a idade de aparecimento do MMD juntamente com a sua localização preferencial em área exposta ao Sol, 79% na cabeça e pescoço, podemos ser levados a concluir que a radiação actínica desempenha um papel importante neste tipo especial de MM. A associação dos 2 factores, idade média mais avançada e localização preferencial na cabeça e pescoço, observa-se também nas séries de Jain e col.<sup>351</sup> e Vongtama e col.<sup>352</sup> O factor actínico pode ainda ser posto em evidência quando sabemos que os 7 doentes da nossa série, com MMD localizados no couro cabeludo, eram todos do sexo masculino, o que poderá ser explicado pela rarefacção capilar mais frequente nos homens. No caso das pernas, apenas observámos um caso e foi numa mulher. Em quase todas as séries existe um predomínio da ocorrência de MMD na cabeça e pescoço, habitualmente acima dos 50%,<sup>356</sup> ao contrário das localizações preferenciais nos tipos convencionais de MM que sabemos serem o tronco no sexo masculino e as pernas no sexo feminino.

A apresentação clínica do MMD difere dos outros tipos de MM pelo que o diagnóstico clínico foi de MM apenas num terço dos casos, tanto nas variedades pura como mista de MMD. Noutro terço dos casos foi colocada como hipótese diagnóstica mais provável, tumor maligno não-MM. Nos restantes casos, o MMD foi confundido clinicamente com patologia

## DISCUSSÃO

dermatológica benigna – nevos melanocíticos comuns (12 casos), quistos (6), cicatrizes (3), verrugas seborreicas (3) e também como hemangioma, lipoma, leiomioma e foliculite (1 vez cada).

Qualquer infiltração cutânea aparente de tipo mesenquimatoso que surja sobre lântigo na face, ou qualquer recidiva de lesão cutânea em cicatriz não pigmentada localizada na cabeça ou pescoço de um paciente idoso, devem recordar-nos a possibilidade de se tratar de um MMD.

Só nos foi possível saber a evolução clínica de 55 dos 113 doentes da nossa série. O tempo de seguimento foi em média de 55 meses, variando entre 1 e 177 meses conforme atrás observado no Quadro 15.

Confirma-se a raridade de metastização ganglionar (apenas um caso nos 55) e um maior número de metástases sistémicas em doentes com a variante mista de MMD, do que com a variante pura que foram 4 e 1, respectivamente.

O tempo de seguimento dos doentes investigados não foi suficiente para obter conclusões sobre o valor prognóstico dos marcadores imuno-histoquímicos adiante referidos.

Na nossa série, 96% dos MMD tinham níveis IV ou V de Clark, com a correspondente maior espessura média de 4,1 mm, sendo cerca de metade dos tumores mais espessos do que 4 mm no momento do seu diagnóstico. Este facto justifica-se a nosso ver pela dificuldade na interpretação clínica destas lesões, que faz com que a biópsia ou excisão só aconteça em fases avançadas da evolução do tumor. O valor médio de Breslow oscilou por um lado entre os 2,0 mm observados por Wharton e col.<sup>347</sup> e os 2,5 mm das séries de Jain e col.<sup>351</sup> e Quinn e col.<sup>280</sup> e por outro lado, entre os 4,8 mm de Hawkins e col.<sup>335</sup> e os 4,9 mm de Anstey e col.<sup>354</sup>

Registámos os valores da espessura de MMD, assim como das percentagens de ulceração, neurotropismo e ausência de pigmento em algumas das maiores séries já publicadas (Quadro 28).

A ulceração é uma variável pouco estudada nas séries mais antigas. Observámos ulceração em 12% dos MMD da nossa série, percentagem semelhante às de Skelton e col.,<sup>282</sup> Arora e col.<sup>350</sup> e Pawlike col.,<sup>340</sup> de 10, 14 e 12%, respectivamente, mas cerca de metade do valor observado nas outras grandes séries de Hawkins e col.,<sup>335</sup> Quinn e col.<sup>280</sup> e Posther e col.<sup>281</sup> com valores reportados de 20%, 21% e 22%, respectivamente.

Quadro 28. Características histológicas do MMD

Autor	Doentes (Nº)	Breslow (mm)	Ulceração %	Neurotropismo %	Amelanótico %
Quinn <sup>280</sup>	280	2.5 (0.2-18.0)	21	32	44
Hawkins <sup>335</sup>	131	4.8/6.5*	20/40*	55	43/38*
Posther <sup>281</sup>	129	4.4 (0.7-19.0)	22	42	ND
Skelton <sup>282</sup>	128	ND	10	ND	ND
Busam <sup>349</sup>	92	ND	20	57	ND
Livestro <sup>303</sup>	89	2.6 (0.1-10.7)	ND	88	20
Arora <sup>350</sup>	65	ND	14	32	ND
Pawlik <sup>340</sup>	65	2.9 (0.6-28.0)	12	ND	ND
Smithers <sup>298</sup>	58	4.3 (0.5-16.0)	ND	41	71
Jain <sup>351</sup>	45	2.5 (0.6-6.0)	ND	27	93
Payne <sup>353</sup>	30	2.6 (0.5-9.5)	ND	17	ND
Egbert <sup>334</sup>	25	ND	ND	24	92
Anstey <sup>354</sup>	25	4.9 (1.0-10.1)	ND	36	80
Wharton <sup>347</sup>	18	2.0 (0.8-3.9)	ND	94	50
Walsh <sup>299</sup>	14	ND	ND	71	46

\*Valores separados nas duas variantes de MMD, puros e mistos.

O neurotropismo foi observado por nós em cerca de 35% dos MMD, em números semelhantes nas duas variantes pura e mista, 37% e 34%, respectivamente. Em relação ao envolvimento neural regista-se a maior dispersão de valores observados em diferentes séries, desde a série de Payne e col.<sup>353</sup> com 17% dos casos com neurotropismo, em contraste com Livestro e col.<sup>303</sup> e Wharton e col.<sup>347</sup> que referem valores de 88% e 94%, respectivamente. O número por nós observado de 35% é muito semelhante ao da série de 280 doentes de Quinn e col.<sup>280</sup> que observaram neurotropismo em 32% dos casos. Na nossa série é de salientar a correlação positiva, estatisticamente significativa, entre a presença de neurotropismo e a maior espessura dos MMD, com um valor de  $p = 0.005$  para os MMD mistos e um  $p = 0.033$  no caso de se tratar de MMD puros.

Na nossa série também observámos grande quantidade de pigmento em 6% dos MMD (2% nas variantes puras e 10% nas mistas) e presença focal de melanina em 23% dos MMD (18%

## DISCUSSÃO

e 27%, respectivamente), depreendendo-se destes números que 71% dos nossos MMD eram amelanóticos, aumentando este número para 4/5 quando nos referimos especificamente aos MMD puros. A ausência de pigmento melânico, pouco referida na maior parte das séries estudadas, é uma das características que dificulta o diagnóstico correcto deste tipo de tumores. Na avaliação do grau de pigmentação também não existe uniformidade entre as séries, que variam desde os 20% de MMD amelanóticos observados por Livestro e col.<sup>303</sup> passando pelos 43% observados por Hawkins e col.<sup>335</sup> nas variantes puras de MMD e pelos 44% de Quinn e col.<sup>280</sup> até aos 92% de Egbert e col.<sup>334</sup> e aos 93% de Jain e col.<sup>351</sup>

A detecção de envolvimento melanocítico atípico da epiderme, mesmo que focal, que ocorreu em cerca de 80% dos casos da nossa série é de grande ajuda no diagnóstico de MMD podendo ocorrer sob a forma de lêntigo maligno, disseminação pagetóide, de MM acrolentiginoso ou até de MM de crescimento superficial.

O formato predominantemente fusiforme das células tumorais, dispersas e isoladas entre os grossos feixes de colagénio da derme, com núcleos pleomórficos ou atípicos apenas em áreas focais, assim como o baixo índice mitótico destas células também são uma das causas da interpretação incorrecta deste tipo de tumores. Na nossa série o padrão celular predominantemente fusiforme foi observado em 85% dos casos, com predomínio de melanócitos epitelióides em cerca de 15% dos casos, valor talvez empolado porque estes tumores são pouco celulares e este tipo de célula é mais chamativo do que as finas células fusiformes. Em 7% dos casos observámos melanócitos multinucleados dispersos pela massa tumoral de forma dispersa. Em 72% dos casos não observámos mitoses, em 23% dos casos contámos 1 a 4 mitoses por 10 campos observados com grande ampliação (objectiva 40x) e só em 5% dos casos detectámos um índice mitótico superior a 5 mitoses por mm<sup>2</sup>. Tanto Quinn e col.<sup>280</sup> como Hawkins e col.<sup>335</sup> registaram percentagens de 28/46/26 e 8/71/21 para um número de mitoses inferior a 1, entre 1 e 4 e superior a 4, respectivamente.

A localização preferencial dos tumores nas áreas expostas ao Sol e a idade dos doentes justifica que elastose solar tenha sido observada em 82% dos doentes da nossa série.

A existência de agregados nodulares de pequenos linfócitos foi por nós observada em 37% dos MMD, principalmente na variante pura (53%), localizando-se preferencialmente em redor e nos limites inferiores da massa tumoral, principalmente nas formas tumorais pouco celulares. Em mais de metade dos casos (62%) observámos infiltrado inflamatório linfocitário perivascular superficial (42%) e também profundo (20%). Pensa-se que a composição do

infiltrado linfocitário não é homogênea e mesmo o seu significado prognóstico é objecto de artigos contraditórios.<sup>357</sup>

Regressão histológica foi estudada por Blessing e col.<sup>358</sup> em 563 MM cutâneos primários, ocorreu com maior frequência nos MM de crescimento superficial e quando localizados no tronco e membros inferiores. Em relação com a espessura dos MM: 46% nos MM finos (<1,5 mm), 32% nos intermédios (1,5-3,0mm) e 9% nos espessos (>3,0mm). Na nossa série observámos regressão em 9 dos 113 MMD (8%), que ocorreu em 1 MMD fino, 4 casos em MMD com espessura intermédia e 4 casos em MMD espessos.

Observámos destruição completa dos folículos pilosos em 27% dos casos, e envolvimento peri-folicular em 30% dos casos. O envolvimento folicular com destruição dos folículos pilosos está de acordo com o facto de o MMD ser uma neoplasia maligna.

Invasão vascular foi observada em 2 casos na nossa série de 113, ambos pertencentes à variante mista de MMD, o que poderá fazer prever um número baixo de metastização por via hematogénea.

Características pouco referidas nas outras séries da literatura, mas por nós estudadas, incluíram a espessura da epiderme (39% dos casos atrófica e 14% hipertrófica) e o registo da presença de faixa de Grenz que ocorreu em 41% dos nossos casos.

Restos de nevo melanocítico têm sido descritos associados a MM em percentagens que variam entre 9% e 58%. Num estudo de 1580 MM, Bevona, Tsao e col.<sup>359</sup> observaram nevos associados a MM em 26% dos casos e concluíram haver uma relação directa entre a sua ocorrência e a localização dos MM no tronco e em indivíduos jovens. Quando examinados por tipo de MM, a associação de nevo foi mais frequente nos MM de crescimento superficial (35,4%), rara nos MM sobre lântigo maligno (3,5%) e ausente em todos os MM acrolentiginosos e nos 13 MMD por eles estudados. Estes achados apoiam a ideia que os diferentes tipos de MM evoluem através de diferentes vias histogénicas.<sup>360</sup> Na nossa série, os 4 casos de MMD com nevo melanocítico associado, ocorreram todos em mulheres, 3 das quais com mais de 71 anos. Três casos estavam localizados na face. Em todos os 4 casos observámos invasão melanocítica atípica da epiderme.

A presença de áreas de estroma mixóide no tumor foi detectada em 23 (20%) dos 113 casos estudados na nossa série, 10 na variante pura e 13 na variante mista de MMD. A mucina presente em grande quantidade em 13 (3/10) casos dá um aspecto neural ao tumor, recordando um neurofibroma.<sup>87</sup> Estudámos a associação de mucina com neurotropismo e observámos

## DISCUSSÃO

presença de neurotropismo em 5 dos 10 casos de MMD puros ricos em mucina, e em 7 dos 13 casos da variante mista de MMD, o que significa que em metade dos MMD ricos em mucina não se observaram aspectos de neurotropismo.

Focos de diferenciação osteo-cartilaginosa estão descritos de MM,<sup>361</sup> seja em MM das mucosas,<sup>362</sup> como em MM acrolentiginosos subungueais.<sup>363;364</sup> Não detectámos metaplasia óssea, nem cartilaginosa, em nenhum dos casos da nossa série.

Pensamos que o recurso mais importante utilizado no diagnóstico de um MMD continua a ser a observação microscópica de múltiplos cortes, corados por H&E, representativos da totalidade do tumor a estudar, que deve ser excisado na sua totalidade com recurso à Cirurgia convencional por bisturi.

A classificação dos tumores é feita com base nas semelhanças morfológicas entre as células do tumor e as células dos tecidos normais. No caso dos tumores de células fusiformes e em virtude de as células não conterem um grau de diferenciação que as permita individualizar, assim como não se agrupam de forma conhecida é necessário recorrer a estudo imuno-histoquímico para a sua classificação.

Exemplo de classificação operativa será o caso do carcinoma espinocelular de células fusiformes que ocorre em área foto-exposta de idosos: começamos por procurar sinais de diferenciação epitelial em H&E como a presença de células disqueratóticas, pérolas de queratina, pontes intercelulares ou áreas de células denominadas epitelióides por conterem um citoplasma vasto eosinofílico. Mesmo não observando qualquer destes aspectos histológicos que nos ajudaria a suspeitar de um carcinoma seria obrigatório efectuar painel de marcadores imuno-histoquímicos contendo pan-citoqueratinas que seriam positivas. Em contexto clínico-patológico praticamente sobreponível, mas com marcação negativa para citoqueratinas, poderíamos suspeitar de um fibroxantoma atípico que se sabe ser um tumor negativo para todos os marcadores com excepção da vimentina. Também teríamos de excluir o diagnóstico de leiomiossarcoma que sabemos ocorrer em doentes na 6.a década de vida, estar localizados habitualmente na superfície de extensão dos membros, mas que ocorre com frequência na face constituído por feixes de células fusiformes entrelaçadas e que não expressam citoqueratinas, sendo positivas para desmina e/ou actina do músculo liso. Não nos podemos também esquecer que a localização preferencial do angiosarcoma é na cabeça e pescoço de doentes idosos, observado histologicamente em área de acentuada elastose solar, por vezes com esboço de

fendas vasculares apenas, tendo também de ser excluídos com recurso a marcadores para células endoteliais como Factor VIII, CD 31 ou mesmo CD34. CD34 é também expresso noutro tumor maligno de células fusiformes denominado dermatofibrosarcoma *protuberans*, com origem fibroblástica e cuja variante pigmentada, denominada Tumor de Bédnar, pode ser confundido com um melanoma de células fusiformes.

Compreendemos assim a importância da introdução de proteína S100 em painel de marcadores para estudo de um tumor maligno de células fusiformes, visto ser um facto conhecido, que todos os tumores acima referidos não expressam habitualmente S100. É conhecido que S100 não é específica de linhagem melanocítica, pois marca tumores nervosos tanto benignos como o neurofibroma, como malignos como o tumor maligno das bainhas nervosas de nervos periféricos (MPNST). Este último, habitualmente localizado nos tecidos moles profundos e que só raramente invade a pele, engloba designações antigas como neurosarcoma, sarcoma neurogénico, neurofibrosarcoma e schwannoma maligno e no fundo agrupa tumores com origens celulares tão díspares como a célula de Schwann, o fibroblasto perineural ou simples fibroblastos.<sup>365</sup> O contexto clínico-patológico habitual é o de um adulto jovem ou de meia-idade com neurofibromatose, que refere o crescimento recente de um tumor localizado numa extremidade proximal. A marcação por S100 é habitualmente de fraca intensidade, marca menos de 50% das células tumorais, e observa-se em cerca de 40% a 80% dos MPNST.<sup>366;367</sup> De ajuda no diagnóstico será a positividade do tumor para outros marcadores nervosos como CD57 observada em 30% a 40% dos casos,<sup>367</sup> NSE (enolase específica de neurónio), proteína neurofilamento e proteína básica mielina em 10% dos casos.<sup>89</sup>

Como vimos atrás o contexto clinico-patológico de lesão tumoral ocorrida na face de idoso, juntamente com a observação microscópica da presença de hiperplasia melanocítica atípica intra-epidérmica ou de pigmento melânico no tumor podem fazer-nos pensar estarmos em presença de um MMD. Para a sua confirmação diagnóstica recorreremos à marcação com proteína S100 que continua a ser o marcador de diferenciação melanocítica mais sensível, pois é positiva difusamente, em todas as lesões melanocíticas benignas e malignas, primárias e secundárias, incluindo o MMD.

A proteína S100 revelou em todos os casos da nossa série, marcação nuclear e citoplasmática, tanto das células fusiformes, com das células epitelióides que constituem o tumor tendo a sua positividade sido utilizada por nós como critério diagnóstico. Infelizmente é pouco específica pelo que a utilizámos em associação com outros marcadores melanocíticos,

## DISCUSSÃO

conforme o Quadro 29 em que se mostra a positividade das células de MMD para outros marcadores de diferenciação melanocítica.

**Quadro 29. Positividade dos marcadores imuno-histoquímicos de diferenciação melanocítica no MMD<sup>101</sup>**

Marcador	N.º de casos positivos/ N.º de casos testados	Sensibilidade (%)
S100	77/78	98.7
HMB-45	16/91	17.6
MELAN-A	8/37	21.6
TIROSINASE	23/87	26.4
MITF	9/58	15.5
P75	26/29	89.7

A origem melanocítica do MMD pode ser confirmada pela expressão de marcadores de diferenciação melanocítica usados em painel. Dos 15 casos por nós testados, apenas em 2 deles observámos expressão concomitante para HMB-45, Melan-A e MITF que foi mais intensa nas células tumorais epitelióides e quando localizadas na epiderme e na derme superficial. Sabendo nós que HMB-45 expressa pré-melanossomas e melanossomas<sup>368</sup> e sendo conhecido por estudos de microscopia electrónica que as células tumorais fusiformes do MMD não contêm grande quantidade destas estruturas celulares poderá ser uma explicação para o facto de tantas células tumorais não expressarem este marcador.<sup>369</sup> Em relação ao Melan-A que usamos para estudar a distribuição dos melanócitos na epiderme, pondo em evidência muitas vezes, formas incipientes de lântigo maligno, temos de ter em atenção que os queratinócitos da camada basal de epiderme de pele exposta ao Sol, podem expressar este marcador.<sup>121,370</sup> Dos dois marcadores melanocíticos mais específicos, Melan-A e HMB-45, o primeiro marca apenas ocasionalmente e de forma focal o componente de células fusiformes dos MMD, enquanto o segundo marcador ainda é menos sensível.<sup>229</sup> Melan-A marca os melanócitos da junção dermo-epidérmica e da derme em todas as lesões melanocíticas benignas e malignas, com excepção das áreas neuro-nevóides. A positividade para Melan-A nos MMD não é consistente, apesar de ser negativo para sarcomas, carcinomas e carcinóides.<sup>371</sup>

O facto de cerca de um quinto dos casos da nossa série não ter compromisso intraepitelial faz-nos pensar se terá havido regressão da lesão melanocítica epitelial, se a sua origem terá sido intradérmica ou até se estaremos em presença de uma metástase de MM, pois é sabido que a variedade desmoplásica de MM pode ocorrer em doentes com MM convencional primitivo de qualquer tipo como MM de crescimento superficial, MM nodular, MM acrolentiginoso ou até MM sobre lântigo maligno.<sup>262</sup>

O MITF é uma proteína nuclear envolvida no desenvolvimento dos melanócitos e na regulação da síntese de melanina, com a grande vantagem de ser um marcador exclusivamente nuclear o que facilita a sua interpretação, principalmente quando as células são muito pigmentadas.<sup>130</sup>

A tirosinase é um marcador específico das lesões melanocíticas, apesar de se poder observar positividade focal em tumores dos nervos periféricos, quando pigmentados.<sup>112</sup> A imunoreactividade para tirosinase e para HMB-45 pode ser aumentada quando se utiliza o micro-ondas para recuperação antigénica.<sup>126</sup> Só um dos 15 MMD testados revelou positividade focal para a tirosinase e esse caso também é um dos que expressou concomitantemente HMB-45, Melan-A e MITF. o trabalho de Boyle e col.<sup>126</sup> Não observámos expressão de tirosinase em nenhum dos nossos 13 casos de MMD negativos para HMB-45, ao contrário do registado por Xu e col.<sup>91</sup> que encontraram 6 casos positivos para tirosinase em 14 MMD HMB-45 negativos, por eles estudados.

A relação entre o KIT e a histologia do MM continua por caracterizar e o seu papel na patologia do MM é ainda desconhecido. C-KIT foi expresso em 2 de 7 casos de uma série de MMD.<sup>318</sup> Num estudo de 70 doentes com MM publicado este ano por Wu e col.<sup>372</sup> estes autores observaram marcação intensa com KIT em 28 casos que parece estar correlacionada directamente com a quantidade de melanina intra-tumoral e inversamente com a localização do MM em área exposta cronicamente ao Sol. A existência de mutação no C-KIT tem muita importância pois existe já comercializado um inibidor do C-KIT denominado imatinib.<sup>135</sup> Neste estudo foram detectadas mutações no exão 11 do KIT por PCR em apenas 2 dos 27 casos positivos para KIT por imuno-histoquímica pois é conhecida a necessidade de pesquisar a presença de mutações do gene KIT por PCR ou FISH e não por imuno-histoquímica. Na nossa série, não observámos expressão de C-KIT pelas células tumorais apesar de se saber que C-KIT marca alguns melanócitos.<sup>373</sup> Nos casos testados na nossa série observámos marcação citoplásmica para C-KIT, em células redondas, que correspondiam a mastócitos.<sup>134</sup>

## DISCUSSÃO

Numa tentativa de descobrir um marcador histoquímico específico, A. Kanik, M. Yaar e J. Bhawan<sup>138</sup> compararam em 1996 a marcação por P75 NGF-R, com S100 e HMB-45 em 13 MM de células fusiformes (5 neurotrópicos, 5 desmoplásicos e 3 de células fusiformes, mas sem neurotropismo, nem desmoplasia). Como vimos atrás, P75 é um receptor de baixa afinidade do factor do factor de crescimento neural e está presente na superfície das células derivadas da crista neural. Não se revelou muito específico pois marcou MM convencionais, nevos “neuróides”, neurofibromas, mas foi negativo em todos os casos de carcinomas espinocelulares de células fusiformes, fibroxantomas atípicos, dermatofibromas e cicatrizes. O marcador HMB-45 foi sempre negativo nas células fusiformes. Em muitos casos o número e intensidade da marcação das células fusiformes com P75 foi maior do que com S100. Concluem afirmando que P75 deve ser incluído num painel de estudo de MM, especialmente útil na distinção entre MMD e MM neurotrópico por um lado, com lesões de células fusiformes sem origem na crista neural, por outro. Uma segunda utilidade será o seu uso na identificação de margens de excisão. Radfar e col.<sup>374</sup> chamaram a atenção para o uso deste marcador no estudo de biópsias de pequenas dimensões ou até quando a marcação por S100 é fraca ou duvidosa. Não nos devemos esquecer que P75, tal como S100, não nos permite distinguir MMD de outras lesões com origem na crista neural. P75-NGFR foi positivo em 12 de 14 MMD testados na nossa série marcando individualmente o citoplasma da quase totalidade das células fusiformes de 10 dos 12 MMD positivos. Esta característica de marcação pode ser muito importante no cálculo da margem cirúrgica de segurança, pois parece estar provado que o número de recidivas tumorais no local da excisão do tumor primário está associado com margens livres de tumor inferiores a 2 cm.<sup>281;350</sup> Se tentamos correlacionar a expressão de P75 com aspectos “neuróides”, como a presença de neurotropismo ou de estroma mixóide, descobrimos que dos 12 casos positivos para P75: 8 tinham neurotropismo e 4 não, enquanto que a presença de mucina no estroma só era abundante num dos casos, focal em 2 e nos restantes 9 casos não detectámos presença de focos de mucina. Por outro lado, nenhum dos 2 casos negativos para P75 tinha presença de mucina no estroma e neurotropismo só se observou num dos 2 casos. É conhecido que P75 é expresso na grande maioria das células fusiformes dos MMD enquanto que só marca menos de 10% das células de MM com fenótipos epitelióides.<sup>313</sup> Esta poderá ser a explicação para o facto de os 2 únicos MMD que não exprimiram P75, foram positivos para os 3 marcadores melanocíticos atrás referidos HMB-45, Melan-A e MITF.

Num dos casos por nós estudado, observámos a presença de um nevo melanocítico intradérmico numa das extremidades do tumor (caso 102) e curiosamente todos os marcadores

de diferenciação melanocítica foram positivos, com uma marcação pouco intensa e apenas na parte superior do nevo pelo HMB-45 e não expressou P75, ao contrário do MMD que apenas expressou S100 e P75.

A expressão de marcadores melanocíticos em células tumorais apenas nos aponta para a origem melanocítica dessas células, mas não nos permite afirmar a malignidade ou benignidade da neoplasia, pois tanto marcam MM como nevos de Spitz ou nevos melanocíticos comuns.

Sabe-se hoje que qualquer neoplasia maligna é constituída por um conjunto heterogéneo de genótipos celulares, e que ocorrem numerosas mutações que podem ter um papel oncogénico sinérgico ou antagonista. As vias moleculares oncogénicas mais estudadas talvez sejam a via da proliferação celular da MAPK e a via inibitória da apoptose celular pela PI-3K. Tentámos assim através de marcação imuno-histoquímica registar e interpretar a presença ou ausência de várias oncoproteínas, utilizando marcadores de proliferação celular, ciclinas, inibidores de ciclinas e inibidores da apoptose.

A contagem de mitoses é importante na avaliação de inúmeros tumores e pode ser difícil de avaliar em H&E não só devido a erros de fixação, artefactos de esmagamento da biópsia como devido à presença de muitas células em apoptose ou ao número baixo de mitoses. Além disto é uma tarefa por vezes muito demorada.<sup>375</sup> Usámos por isso a marcação com MPM-2 que confirmou que o MMD se trata de um tumor maligno com um baixo índice mitótico. Parece haver correlação com o número de mitoses contadas em H&E pois, nos 2 casos que expressaram MPM-2 registámos 6 e 5 mitoses/mm<sup>2</sup>.

Utilizámos também o marcador Ki-67 que expressou mais de 5% das células tumorais em 9/14 casos por nós testados. A aparente discrepância com os resultados do MPM-2 resulta de que enquanto este marcador é específico para células que se encontrem em mitose, o Ki-67 marca todas as células em fase proliferativa de ciclo celular, portanto só não marca as células em repouso na fase G0. Quatro dos 5 casos em que registámos mitoses em H&E, do grupo de 14 casos testados para Ki-67, expressaram este marcador.

O interesse do estudo da presença de mutações de genes ligados ao cancro e a detecção de proteínas aberrantes em neoplasias terá uma aplicação importante, num futuro próximo, não só pelo seu interesse diagnóstico, como na separação dos doentes em sub-grupos homogéneos de prognóstico, como e talvez mais importante, por vir a possibilitar uma selecção de terapêutica quase individualizada.

## DISCUSSÃO

É conhecido que cerca de 20% das mutações ocorrem no gene NRAS dos MM de crescimento superficial, que é muito rara nos MM localizados na pele exposta cronicamente ao Sol e que está praticamente ausente no MM acrolentiginoso e no MM das mucosas.<sup>6</sup> NRAS controla as duas vias de oncogénese: MAPK e PI3K/AKT, mas que por si só, esta mutação não é suficiente para produzir MM. Necessita de outras mutações associadas, sendo a mais frequente a ocorrida no locus CDKN2A que exprime P16 e P14ARF, que actuam indirectamente por inibição do retinoblastoma e do p53, respectivamente.<sup>193</sup>

A mutação BRAF que ocorre em mais de 60% dos MM é mutuamente exclusiva com a mutação RAS, e corresponde na maioria dos casos apenas a uma substituição V600E aumentando em cerca de 500 vezes o poder proliferativo da célula tumoral.<sup>188</sup> É de salientar que 80% dos nevos melanocíticos comuns têm esta mutação,<sup>28</sup> que se encontra ausente nos MM familiares<sup>376</sup> e nos MM oculares.<sup>377</sup> A importância relativa da mutação T-A no BRAF, observada na tumorigénese melanocítica, não é com certeza a mesma nos vários subtipos de MM, mesmo nos MM cutâneos, associados com a exposição solar.<sup>194</sup> Em contraste com os MM convencionais, a variedade desmoplásica não se relaciona aparentemente com uma activação da mutação BRAF pois não detectámos a mutação em nenhum dos 15 doentes testados. Este achado é mais um indicador de que os MM não devem ser olhados como um grupo uniforme pois poderão estar em jogo outras mutações genéticas.<sup>378</sup>

PTEN que é uma proteína oncosupressora que actua na via do PI3K promovendo a apoptose das células tumorais. A mutação do gene que codifica a PTEN, localizado no braço longo do cromossoma 10, é tal como o BRAF, uma mutação mutuamente exclusiva com a do RAS. A mutação do PTEN ocorre em cerca de 30% dos MM quase sempre juntamente com a mutação do BRAF. A ocorrência destas duas mutações em simultâneo actuará nas duas vias MAPK/PI3K, assemelhando-se ao efeito da mutação RAS a montante. Goel e col.<sup>315</sup> relacionam a ausência de PTEN com o aumento da espessura dos MM, sendo mesmo considerado por eles um sinal de progressão tumoral. Na nossa série de 15 casos testados, o PTEN estava ausente em 8. Ao contrário dos resultados de Goel e col., quando comparámos a presença ou ausência de marcação por PTEN com o nível de Breslow observámos uma média de espessura dos MMD de 8,3 mm e de 5,7 mm para os dois grupos, respectivamente.

Duas proteínas p16 e CDK4 interagem funcionalmente no controle da fosforilação de retinoblastoma e portanto as suas mutações concomitantes não ocorrem, por serem redundantes. Sendo assim é de prever por um lado a existência de um aumento da actividade

CDK4 e da ciclina D1 que se junta para formarem um complexo de activação de proliferação tumoral, ou por outro lado, uma diminuição dos inibidores do CDK4, pertencentes ao grupo INK4, como as proteínas P16 e P19.<sup>379</sup> Na nossa série a Ciclina D1 que se encontra habitualmente aumentada nos MM foi positiva em 11 de 14 MMD testados, CDK4 foi negativa em 14 dos 15 casos testados tendo sido apenas as duas concomitantemente positivas num dos casos. Alguns dos CDKi da família INK4, que se encontram muitas vezes diminuídos em MM, foram por nós testados como o P16 que foi negativo em 6 dos 14 casos testados e o P19 que foi negativo em todos os 14 casos testados.

Retinoblastoma que sabemos ser muito importante no controle celular, impedindo que células danificadas ultrapassem a fase celular G1, impedindo a sua passagem à fase S, de síntese de ADN, a partir da qual a célula se poderá imortalizar. Retinoblastoma que foi por nós testado por imuno-histoquímica estava presente em 11 dos 15 casos testados, mas este dado não nos permite avaliar se a marcação corresponde à sua forma activa hipofosforilada ou inactiva hiperfosforilada.

CDK2, que costuma estar elevado na fase S do ciclo celular de tumores, actua sob a forma de um complexo com as Ciclinas A ou E. CDK2 encontrava-se presente em 8 dos 15 MMD por nós testados. Os seus inibidores, P21 e P27, encontravam-se aumentados em 4 dos 13 casos testados e em 8 dos 15 casos testados, respectivamente.

No tipo particular de MM por nós estudado, o MMD, algumas perguntas se podem colocar, nomeadamente qual a origem da desmoplasia e que tipo de células a constituem.

A origem da desmoplasia nos tumores malignos é controversa. Na maioria dos tumores malignos (por exemplo, carcinoma cirroso da mama e linite plástica do estômago) o fibroblasto e o miofibroblasto têm sido implicados na reacção benigna do estroma às células malignas.<sup>380;381</sup> Em alguns tumores contudo, a desmoplasia e a forma fusiforme das células foi interpretada como fibroplasia adaptativa, processo em que as células tumorais malignas, não fibroblastos, adquirem a capacidade de produzir colagénio, um achado não habitual na célula original. Este fenómeno foi anteriormente descrito em alguns tumores epiteliais de células fusiformes<sup>382-384</sup> e em mesoteliomas desmoplásicos.<sup>385;386</sup>

Em alguns MMD pensa-se que as células tumorais melanocíticas adquirem a capacidade funcional e os achados ultraestruturais de células da linhagem fibroblástica. Foi sugerido que as células fusiformes representam uma metaplasia mesenquimatosa das células neoplásicas.<sup>382</sup> Uma explicação alternativa deste fenómeno consiste na fusão celular entre as células

## DISCUSSÃO

neoplásicas, por um lado, e os fibroblastos e miofibroblastos, pelo outro.<sup>383</sup> Esta expressão funcional e morfológica dos melanócitos malignos no MMD poderia corresponder a heterogeneidade tumoral.<sup>387</sup>

Para Labrecque e col.<sup>388</sup> a desmoplasia no MMD é um processo reactivo benigno, enquanto para Conley e col.<sup>266</sup> e Valensi e col.<sup>372,373</sup> este processo é melanocítico e maligno.

Lynn From e col.<sup>389</sup> em um estudo de microscopia electrónica, revelaram a presença de pré-melanossomas e de melanossomas em células fusiformes que mostravam diferenciação fibroblástica e miofibroblástica, tanto em MMD primário como em metástase. O facto de as células fusiformes não evidenciarem actividade fagocítica e de os melanossomas não se encontrarem ligados a membrana (*membrane-bound*) indicam que a melanina citoplasmática não foi fagocitada. Concluíram assim que os melanócitos seriam transformados em fibroblastos “adaptativos” capazes de sintetizar simultaneamente colagénio e melanina.

Winnepenninck e col.<sup>318</sup> publicaram em 2003 na *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* um estudo do fenótipo de 9 MM de células fusiformes, usando marcadores melanocíticos, neurais e mesenquimatosos. As células neoplásicas exprimiram marcadores melanocíticos S100, Mel-CAM e NKIC3, mas foram negativas para HMB-45 e Melan-A, enquanto que a Tirosinase e o C-KIT foram positivos em 2 de 7 casos estudados. A maioria dos casos exprimiu marcadores neurais, como o receptor do factor de crescimento neural P-75, a molécula de adesão à célula neural e o NSE. Todos os casos exprimiram vimentina, mas foram negativos para os marcadores mesenquimatosos CD34 e AML. Todos os MM de células fusiformes mostraram uma expressão difusa e forte para os marcadores fibroblásticos CD90 (Thy) e CD13 (aminopeptidase N) e também exprimiram com intensidades variadas a enzima hidroxilase-4-prolil envolvida na formação de procolagénio. Especulou que a co-expressão de marcadores melanocíticos, neurais e fibroblásticos sugere uma diferenciação bidireccional dos melanócitos neoplásicos para (mio)fibroblastos e células de Schwann, um achado confirmado por microscopia electrónica. Concluiu que a não-marcação por CD90 e CD13 numa grande variedade de lesões melanocíticas, sugere a especificidade destes marcadores no MM de células fusiformes. Os nossos resultados contrariam esta afirmação de Winnepenninck e col. pois de 15 MMD testados com CD13, só apenas em um observámos positividade focal para este marcador fibroblástico.

Pode pensar-se que o MMD esteja associado com uma inequívoca proliferação miofibroblástica. Kacerovska, Kazakov, Kutzner e col.<sup>390</sup> efectuaram marcação imuno-histoquímica dupla com proteína S100 e AML (actina do músculo liso) em MMD, que não evidenciou co-expressão destes dois anticorpos nas mesmas células tumorais, apesar de cada marcador individualmente demonstrar a presença de duas áreas celulares distintas no mesmo tumor, com marcação positiva para cada um dos dois anticorpos usados individualmente. Nos 15 MMD por nós testados, com AML, apenas um expressou moderadamente este marcador.

Em estudos de microscopia electrónica foi demonstrada a presença de achados citológicos malignos no componente miofibroblástico, incluindo alta celularidade, pleomorfismo e mitoses atípicas que preenchem os critérios de corresponder a um sarcoma de baixo grau.<sup>390</sup>

Os mecanismos histogenéticos deste fenómeno são especulativos, podendo admitir-se duas possibilidades. Primeira hipótese, a presença de um componente miofibroblástico pode ser atribuída a uma transformação metaplásica maligna (diferenciação divergente), semelhante ao que ocorre nos carcinomas sarcomatóides metaplásicos ou gliosarcomas. É um fenómeno bem conhecido, que os carcinomas do tracto genital feminino, especialmente com origem no útero e nos ovários, podem produzir um componente sarcomatóide de células fusiformes que frequentemente, mas não sempre, é positivo para citoqueratinas. Raramente, este componente sarcomatóide revela morfologia heteróloga de rabdomiosarcoma ou de condrosarcoma, sendo totalmente desprovido de características epiteliais a todos os níveis, morfológico, imuno-histoquímico e até ultraestrutural. No entanto, quando estes carcinomas metaplásicos metastizam, originam metástases de carcinomas puros, desprovidos de quaisquer aspectos sarcomatóides do tumor que lhe deu origem. Estão descritos casos de carcinoma papilar seroso puro, localizados no útero, sem componente metaplásico, cujas metástases correspondem a carcinoma metaplásico exibindo aspectos de carcinoma papilar seroso com componente sarcomatóide de células fusiformes, negativo para citoqueratinas. Uma segunda possibilidade, alternativa, em que as células do MMD induziriam inicialmente uma proliferação miofibroblástica reactiva, que só mais tarde se tornaria maligna, após razões desconhecidas (radiação actínica?).<sup>391</sup>

Apesar de ainda não compreendermos totalmente o papel da biologia do estroma, na progressão tumoral, parece ser cada vez mais evidente que o tumor maligno é influenciado por sinais com origem no estroma. Foi demonstrado que anomalias genéticas nos tecidos envolventes do tumor condicionam alterações nas interacções recíprocas entre as células

## DISCUSSÃO

epiteliais e mesenquimatosas, desempenhando um papel importante na carcinogénese mamária.<sup>392</sup> Foi descoberto que fibroblastos associados ao carcinoma da mama e os seus complementos (*counterparts*) mostram alterações específicas de neoplasia.<sup>393</sup> No que diz respeito às lesões melanocíticas, especula-se que as interações entre o MM e o estroma são importantes, e que o diálogo entre MM e os fibroblastos, mediado por factores solúveis e pelo contacto directo célula a célula, pode resultar na activação do estroma e contribuir assim para a progressão tumoral.<sup>394</sup>

A ausência de expressão de Fascina parece estar associada a um maior risco de metastização.<sup>395</sup> Registámos ausência de marcação por Fascina em 10 dos 14 MMD da nossa série, mas não foi possível relacionar com a metastização.

Num estudo da expressão de N-caderina em 21 MMD realizado por Attis e col.<sup>316</sup> em 2006 e publicado na *Human Pathology* foi demonstrado que 10 casos foram fortemente positivos, 3 focalmente positivos e 8 negativos para este marcador e que do grupo de 7 doentes (n = 21) que tiveram metástases à distância, 6 expressavam fortemente N-caderina. Concluíram que a N-caderina pode ser um marcador útil na identificação de um subgrupo de MMD com maior potencial metastático. No nosso estudo das células tumorais de MMD efectuado com N-caderina salientamos a expressão em 11 dos 15 casos estudados. Infelizmente o tempo de seguimento deste grupo de doentes não é suficientemente longo para podermos relacionar este dado com a eventual maior probabilidade de metastização do tumor.

O registo completo das variáveis clínicas, histológicas e imuno-histoquímicas estudadas encontra-se disponível, em formato electrónico, no CD que acompanha este trabalho.

Trata-se, por conseguinte, de um estudo retrospectivo, observacional. Como é quase de regra em estudos deste tipo, há o registo de um grande número de variáveis, e comparativamente poucos casos. Inicialmente, antes de obtidos os dados de seguimento, não havia uma variável resposta que focasse a inquirição estatística; além disso, quase todas as variáveis respeitavam a características qualitativas, dando origem a meras contagens.

A única variável obtida por medição — Breslow — apresenta registos que claramente revelam que há uma alteração de escala com a variação da espessura: valores inferiores a 3 mm são em geral medidos até às décimas da unidade de medição, valores superiores a 4 mm são em geral registados como valores inteiros, o que poderia ser embaraçoso no caso de haver outras variáveis contínuas que nos levassem a estudos de correlação ou regressão.

Assim, predominam neste ficheiro variáveis nominais (mesmo no caso em que se tinha tentado fazer observações politómicas originando variáveis ordinais, a escassez de registos nas classes levou posteriormente a uma necessidade de redução dicotómica, com concomitante passagem a variáveis nominais). Limita isso grandemente a exploração estatística dos dados, que fica restringida a uma pesquisa de associações entre variáveis qualitativas, ou a uma investigação de aleatoriedade na classificação dos dados.

No que respeita a investigação da aleatoriedade, estamos também a referir-nos ao seguinte: usando a variável Breslow para reordenar os dados, pode testar-se a hipótese nula de aleatoriedade de um atributo dicotómico com base na contagem de *runs* (sequências) de 0 (zero) e 1 (um).

No que respeita a investigação de associações, os dados podem ser organizados em tabelas de contingência (neste caso de margens livres), e usar-se as metodologias clássicas de análise de tabelas de contingência no caso bidimensional (com eventual recurso a algoritmos exactos, em vez da aproximação do qui-quadrado, sempre que a escassez de dados levante dúvidas sobre a qualidade da aproximação), e modelos log-lineares no caso de dimensionalidade mais elevada. O resumo tabular da informação e apresentação gráfica dos dados ajudam também ao seu conhecimento.

Os dados são deficientes em perspectiva estatística e por isso as conclusões devem ser cuidadosamente ponderadas e recomenda-se, por exemplo, a leitura de: *Biometrical Interpretation*,<sup>396</sup> *Intuitive Biostatistics*,<sup>397</sup> *Statistical Rules of Thumb*<sup>398</sup> e resta-nos esclarecer que no que se refere aos resultados, a exploração estatística foi feita a nível descritivo elementar, com a parte de estatística inferencial (análise de possíveis associações) feita com apoio do *package* estatístico R. Em todas as situações em que é posta em causa a aproximação do qui-quadrado, usaram-se algoritmos de cálculo “exactos”.

Devido ao facto do presente trabalho se inscrever numa corrente de investigação de vários autores perspectivámos fazer um estudo de meta-análise harmonizando os nossos resultados com os de outros investigadores. A meta-análise tem um relevo cada vez maior em publicação científica, nomeadamente em Medicina, e a série de artigos de Davey e col.<sup>399-401</sup> e Egger e col.<sup>402;403</sup> publicados a convite do Editor no *British Medical Journal* são um indicador seguro da importância desta matéria. No entanto não existem, por enquanto, sínteses meta-analíticas sobre MMD, existindo apenas uma revisão sistemática de Lens e col.<sup>356</sup> que muitos consideram ser o grau zero da meta-análise.

## DISCUSSÃO

O artigo de Lens e col.<sup>356</sup> assume-se no próprio título como uma revisão sistemática: *Desmoplastic malignant melanoma: a systematic review*, e não como uma síntese meta-analítica. De facto há, do ponto de vista conceptual, uma diferença grande entre os dois conceitos. Uma revisão sistemática procura fazer um balanço da bibliografia sobre um determinado assunto (escolhida com um filtro que deve ser claramente indicado, neste trabalho os estudos foram realizados com pelo menos 10 participantes reportando características clínicas e histológicas do tumor); as conclusões possíveis são em geral mais alicerçadas em bom senso do que em métodos formais da Estatística, ainda que se procure organizar informação quantitativa e qualitativa existente na literatura estudada, não ultrapassando muitas vezes estatística descritiva.

As sínteses meta-analíticas são mais ambiciosas. Começam, como as revisões sistemáticas, por uma selecção dos estudos que se procura sintetizar/harmonizar.

Em geral, os objectivos são chegar a conclusões de síntese usando informação dispersa, nomeadamente:

- Construção de uma estimativa sintética de um parâmetro, e indicação de um intervalo de confiança, usando os dados que suportaram os estudos incluídos, ou, na sua ausência, os intervalos de confiança neles reportados (tendo em linha de conta, evidentemente, a dimensão das amostras que cada estudo usou, e a influência que isso teve no cálculo de erros padrões).
- Síntese meta-analítica de diversos testes, por exemplo sobre o efeito médio de um tratamento, ou comparação de efeitos médios de diversos tratamentos, o que exige em geral o cômputo de uma escala comum para relativizar diferenças observadas. Tal como no caso anterior, isso é em geral viável para a análise de efeitos MEDIDOS, e os métodos mais interessantes assumem que os dados são gaussianos, ou que existe uma transformação adequada (*key inferential function*), em geral associada a métodos de estabilização da variância, que permitem obter dados transformados adequados a um ajustamento gaussiano.
- Existem ainda formas de meta-analisar diversas tabelas de contingência (testes de Cochran-Mantzel-Haenszel), apropriados para dados nominais — desde que se tenha acesso por exemplo aos valores-p dos testes feitos pelos diversos autores (a informação de níveis de significância não é suficiente).

Assim, no caso de MMD não existem sínteses meta-analíticas, porque os estudos publicados não contêm suficiente informação quantitativa para se fazer estudos meta-analíticos credíveis.

A esperança residiu durante algum tempo, num novo desenvolvimento da meta-análise, chamada meta-análise cumulativa. Consiste no acumular de informação, obtida passo a passo, em patologias muito raras ou em que os tratamentos sejam dispendiosos ou muito dolorosos, até se poder chegar a evidência q.b.; mas no que se refere aos marcadores, ainda não foi alcançada.

A acumulação de anotações sobre trabalhos publicados por diversos autores convenceu-nos, porém, que é ainda prematuro fazer uma meta-análise sobre MMD, porque a informação publicada incide sobretudo sobre dados qualitativos, e mesmo estes têm um grau de objectividade contestável. Foram publicados recentemente diversos “manuais” de meta-análise, que dão conta do avanço desta subárea da Estatística: *Statistical Meta-Analysis with Applications*,<sup>404</sup> *Introduction to Meta-Analysis*<sup>405</sup> e *Meta Analysis – A Guide to Calibrating and Combining Statistical Evidence*.<sup>406</sup> Em nenhum deles, há métodos compatíveis com o tratamento de dados nominais como aqueles de que dispomos na série de 113 casos que tratámos.

Citando Egger and Davey Smith<sup>403</sup> “...*These examples have been taken to suggest that further studies in large numbers of patients may be at best superfluous and costly, if not unethical, once a significant treatment effect is evident from meta-analysis of the existing smaller trials...*” parece justificar a tentativa de, com custos moderados, contribuir para o estudo do valor diagnóstico e prognóstico dos marcadores imuno-histoquímicos no MMD.

## CAPÍTULO 7

### Conclusões

No presente trabalho estudámos as características clínicas e histológicas de uma série de 113 doentes com melanoma maligno desmoplásico (MMD) e as características imuno-histoquímicas de um subgrupo de 15 desses doentes, tentando estabelecer o valor diagnóstico e prognóstico de algumas destas características.

O estudo foi efectuado com recurso a uma grande série de casos desta patologia, relativamente rara, e dele concluímos ser este tumor maligno uma entidade clínico-patológica de difícil diagnóstico por:

- Ausência de pigmento melânico em cerca de 80% dos casos.
- Morfologia celular predominante constituída por células fusiformes dispersas num estroma fibroso, que se assemelham a fibroblastos.
- Baixo índice celular mitótico.
- Ausência de componente tumoral intra-epidérmico em cerca de um quinto dos casos.
- Ausência de marcador imuno-histoquímico com 100% de especificidade que permita um diagnóstico de certeza. Daqui resulta a necessidade de recurso a painel de marcadores que auxiliem no diagnóstico diferencial com outras neoplasias de células fusiformes.

Clinicamente, concluímos que o tumor se localiza preferencialmente em áreas de exposição crónica à radiação actínica, particularmente na face de indivíduos idosos. A idade média de apresentação foi de 71 anos e variou entre os 43 e os 92 anos. Quatro em cada 5 dos doentes estudados tinham mais de 60 anos na altura do diagnóstico. Quando relacionámos o sexo dos doentes com a idade de aparecimento do tumor, encontramos predominância do sexo masculino sempre que o MMD surgiu em doentes com menos de 71 anos de idade e do sexo feminino quando surgiu acima dos 71 anos.

O MMD é uma neoplasia maligna, confirmada pela sua metastização e surgiu como causa de morte em 7 de 55 doentes, avaliados à data da execução deste trabalho. Esta variedade de MM tem um comportamento bastante semelhante a um sarcoma uma vez que a metastização para os gânglios linfáticos regionais é excepcional, apesar da ocorrência de metástases à distância Estes achados, na nossa opinião questionam a realização, por rotina, de biopsia de gânglio sentinela em doentes afectados por este tumor.

Por histologia, identificámos no MMD dois tipos de melanócitos – fusiformes e epitelióides, com franco predomínio do primeiro tipo celular. Estes são habitualmente pleomórficos, de núcleos quase sempre vesiculosos e hipercromáticos, com baixo índice mitótico e estão dispersos por estroma conjuntivo denso. Em cerca de um quinto dos casos existem depósitos de mucina no estroma, o que confere aspecto de neurofibroma.

Concluimos ainda que:

- Quanto maior foi a espessura tumoral, maior foi a ocorrência de neurotropismo ( $p < 0,5$ ). Pensamos ser este achado importante para o diagnóstico, podendo ainda ter valor prognóstico.
- A separação entre as variantes “pura” e “mista ou combinada” de acordo com a área ocupada pela desmoplasia parece não ter interesse nem no diagnóstico clínico, nem no histológico. No entanto as metástases à distância ocorreram com menor frequência na variante “pura” o que indicia eventual interesse prognóstico.
- Os agregados nodulares de pequenos linfócitos, no interior ou em redor da neoplasia, esboçando por vezes a formação de centros germinativos, estavam presentes em mais de metade dos casos da variante pura de MMD. Este achado histológico pode constituir suspeita diagnóstica de MMD e além disso especulamos o seu significado reaccional.
- É quase constante a ausência de nevo melanocítico associado ao MMD; deduzimos assim estarmos em presença de um tumor melanocítico formado “de novo”.
- Que o diagnóstico histológico é efectuado quase sempre quando o tumor invade a derme profunda ou mesmo a hipoderme (96% têm um nível de Clark IV ou V) e em metade dos doentes o tumor tem uma espessura igual ou superior a 4 mm, com o conseqüente pior prognóstico. Concluimos da análise dos diagnósticos clínicos provisórios á data da biopsia e da correlação clínico-patológica estarmos em presença de um tumor de difícil diagnóstico e portanto de excisão tardia em avançado estado de evolução.

## CONCLUSÕES

- Apesar da grande espessura observada aquando da realização do seu diagnóstico, a ulceração ocorreu apenas em 12% dos casos.
- Invasão vascular apenas se demonstrou em 1% dos casos.
- Nunca se observou metaplasia óssea, nem cartilaginosa.

Do estudo imuno-histoquímico concluímos que as células tumorais expressam poucos marcadores de diferenciação melanocítica, que interpretamos como consequência da baixa diferenciação desta variedade de MM. Foi excepção a proteína S100 que foi sempre positiva e por nós utilizada como um dos critérios diagnósticos. O marcador P75 foi fortemente expresso pelas células tumorais fusiformes, pelo que na nossa óptica tem grande utilidade no diagnóstico de MMD. Pelo contraste de marcação entre as células tumorais e as da restante peça, este marcador surge-nos como importante no estudo das margens cirúrgicas livres de tumor.

A presença de células positivas para C-KIT, em cerca de metade dos doentes, deixa-nos pista para potencial interesse terapêutico.

Segundo o nosso estudo, as células tumorais do MMD têm um alto índice proliferativo, expresso pela forte marcação pelo Ki-67 e baixo índice mitótico, também demonstrado pela baixa expressão do marcador MPM-2. Além disso, estas células não expressam marcadores de diferenciação fibroblástica (CD13), vascular (CD34) ou muscular (AML).

Destacamos do estudo com marcadores de sinalização e progressão tumoral, o aumento de expressão de Ciclina D1, a ausência de expressão de CDK4, assim como a quase total ausência dos seus inibidores, particularmente P19 e em menor número de casos P16.

A CDK2, em regra elevada em tumores malignos, foi positiva em metade dos casos. Os seus inibidores P21 e P27, habitualmente negativos nos MM, foram negativos em 4 de 13 e em 8 de 15 MMD testados.

Em cerca de metade dos casos não se detectou presença da proteína oncosupressora PTEN. Quando comparados os 2 grupos de PTEN, negativo e positivo e os correlacionámos com a espessura média dos MMD, verificámos um valor médio de espessura tumoral de 5,7 mm e de 8,3 mm para os 2 grupos, respectivamente.

Retinoblastoma foi positivo em cerca de  $\frac{3}{4}$  dos casos estudados por imuno-histoquímica, por vezes com marcação muito intensa- O seu significado é incerto pois desconhecemos estarmos em presença da sua forma activa hipofosforilada, da inactiva hiperfosforilada ou da existência de mutação.

Concluímos também da ausência de mutação V600E do gene *BRAF*.

Este conjunto de dados levam-nos a sugerir que o tumor resulte essencialmente da inibição da apoptose das células tumorais, representada pela ausência de PTEN e de P19 e não só pela via proliferativa do MAPK, expresso pelo escasso número de mitoses. Especulamos assim, ter o dano actínico crónico papel importante na génese deste tumor.

A grande maioria das células tumorais expressava N-caderina e Fascina indiciando existência de dois subgrupos de MMD, com prognósticos distintos. Contudo, pelo curto período de seguimento dos doentes, não nos foi possível estabelecer relações prognósticas precisas. A marcação por N-caderina poderá indicar tumores com maior capacidade de metastização.

Do estudo estatístico realizado concluímos não ser possível a realização de avaliação por meta-análise, mesmo com recurso à meta-análise cumulativa, uma vez que os estudos publicados não contêm suficiente informação quantitativa.

## CAPÍTULO 8

### Bibliografía

1. Ackerman AB, Cerroni L, Kerl H. *Pitfalls in the histopathologic diagnosis of malignant melanoma*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994.
2. Cramer SF. Judging mistakes in pathology--res ipse non loquitur. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1430-2.
3. de Almeida LS, Requena L, Rutten A *et al*. Desmoplastic malignant melanoma: a clinicopathologic analysis of 113 cases. *Am J Dermatopathol* 2008;30:207-15.
4. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 2004;84:1155-228.
5. Luo R, Gao J, Wehrle-Haller B, Henion PD. Molecular identification of distinct neurogenic and melanogenic neural crest sublineages. *Development* 2003;130:321-30.
6. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T *et al*. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005;353:2135-47.
7. Slominski A, Paus R, Mihm MC. Inhibition of melanogenesis as an adjuvant strategy in the treatment of melanotic melanomas: selective review and hypothesis. *Anticancer Res* 1998;18:3709-15.
8. Unna PG. Naevi und Naevocarcinome. *Berliner Klin Wochenschr* 1893;30:14-6.
9. Masson P. My conception of cellular nevi. *Cancer* 1951;4:9-38.
10. Mishima Y. Macromolecular changes in pigmentary disorders. *Arch Dermatol* 1965;91:519-57.
11. Cramer SF. The histogenesis of acquired melanocytic nevi. Based on a new concept of melanocytic differentiation. *Am J Dermatopathol* 1984;6 Suppl:289-98.
12. Cramer SF. The origin of epidermal melanocytes. Implications for the histogenesis of nevi and melanomas. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:115-9.
13. Krenzel S. Nevogenesis--new thoughts regarding a classical problem. *Am J Dermatopathol* 2005;27:456-65.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

14. Carlson JA, Slominski A, Linette GP, Mihm MC, Jr., Ross JS. Biomarkers in melanoma: predisposition, screening and diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:163-84.
15. Carlson JA, Ross JS, Slominski A *et al.* Molecular diagnostics in melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2005;52:743-75.
16. Kaddu S, Smolle J, Zenahlik P, Hofmann-Wellenhof R, Kerl H. Melanoma with benign melanocytic naevus components: reappraisal of clinicopathological features and prognosis. *Melanoma Res* 2002;12:271-8.
17. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
18. Ramirez-Montagut T, Turk MJ, Wolchok JD, Guevara-Patino JA, Houghton AN. Immunity to melanoma: unraveling the relation of tumor immunity and autoimmunity. *Oncogene* 2003;22:3180-7.
19. Ivanov VN, Bhoumik A, Ronai Z. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene* 2003;22:3152-61.
20. Goding CR. Melanocyte development and malignant melanoma. *Forum (Genova)* 2000;10:176-87.
21. Daniotti M, Oggionni M, Ranzani T *et al.* BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma. *Oncogene* 2004;23:5968-77.
22. Widlund HR, Fisher DE. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 2003;22:3035-41.
23. Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G *et al.* Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 2002;1:279-88.
24. Pham K, Milovanovic T, Barr RJ, Truong T, Holcombe RF. Wnt ligand expression in malignant melanoma: pilot study indicating correlation with histopathological features. *Mol Pathol* 2003;56:280-5.
25. Tsao H, Mihm MC, Jr., Sheehan C. PTEN expression in normal skin, acquired melanocytic nevi, and cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2003;49:865-72.
26. Smalley KS. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int J Cancer* 2003;104:527-32.
27. Smalley KS, Herlyn M. Loitering with intent: new evidence for the role of BRAF mutations in the proliferation of melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 2004;123:16-7.
28. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003;33:19-20.
29. Yazdi AS, Palmedo G, Flaig MJ *et al.* Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 2003;121:1160-2.
30. Rimoldi D, Salvi S, Lienard D *et al.* Lack of BRAF mutations in uveal melanoma. *Cancer Res* 2003;63:5712-5.

## BIBLIOGRAFIA

31. Cruz F3, Rubin BP, Wilson D *et al.* Absence of BRAF and NRAS mutations in uveal melanoma. *Cancer Res* 2003;63:5761-6.
32. Vajdic C, Krickler A, Duffy DL *et al.* Ocular melanoma is not associated with CDKN2A or MC1R variants--a population-based study. *Melanoma Res* 2003;13:409-13.
33. Bastian BC, Kashani-Sabet M, Hamm H *et al.* Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Res* 2000;60:1968-73.
34. Bastian BC, Olshen AB, LeBoit PE, Pinkel D. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *Am J Pathol* 2003;163:1765-70.
35. Poetsch M, Dittberner T, Woenckhaus C. Can different genetic changes characterize histogenetic subtypes and biologic behavior in sporadic malignant melanoma of the skin? *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1923-32.
36. Noonan FP, Recio JA, Takayama H *et al.* Neonatal sunburn and melanoma in mice. *Nature* 2001;413:271-2.
37. Jhappan C, Noonan FP, Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 2003;22:3099-112.
38. Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, Hughes MC, Hayward NK, Green AC. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:806-12.
39. Whiteman DC, Stickley M, Watt P, Hughes MC, Davis MB, Green AC. Anatomic site, sun exposure, and risk of cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2006;24:3172-7.
40. Meltzer PS. Genetic diversity in melanoma. *N Engl J Med* 2005;353:2104-7.
41. Flaherty KT. New molecular targets in melanoma. *Curr Opin Oncol* 2004;16:150-4.
42. Gaggioli C, Sahai E. Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res* 2007;20:161-72.
43. LeBoit PE. Pictures of a unicorn? *Am J Dermatopathol* 2003;25:88-91.
44. Orlet HK, Still J, Law E, Gertler C. Malignant melanoma in a burn scar. *Ann Plast Surg* 2001;46:59-61.
45. Kikuchi H, Nishida T, Kurokawa M, Setoyama M, Kisanuki A. Three cases of malignant melanoma arising on burn scars. *J Dermatol* 2003;30:617-24.
46. Inbar M, Matzkin H, Rozin RR, Chaitchik S, Klauzner JM. Malignant melanoma developing in an irradiation field. *Br J Radiol* 1988;61:519-20.
47. Trefzer U, Voit C, Milling A, Audring H, Sterry W. Malignant melanoma arising in a radiotherapy field: report of two cases and review of the literature. *Dermatology* 2003;206:265-8.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

48. Sarkany I. Malignant melanomas in Lymphoedematous arm following radical mastectomy for breast carcinoma (an extension of the syndrome of Stewart and Treves). *Proc R Soc Med* 1972;65:253-4.
49. Tindall B, Finlayson R, Mutimer K, Billson FA, Munro VF, Cooper DA. Malignant melanoma associated with human immunodeficiency virus infection in three homosexual men. *J Am Acad Dermatol* 1989;20:587-91.
50. Euvrard S, Kanitakis J, Pouteil-Noble C, Claudy A, Touraine JL. Skin cancers in organ transplant recipients. *Ann Transplant* 1997;2:28-32.
51. Pielop JA, Brownell I, Duvic M. Mycosis fungoides associated with malignant melanoma and dysplastic nevus syndrome. *Int J Dermatol* 2003;42:116-22.
52. Esteves JA, Baptista AP, Rodrigo FG, Gomes MM. Disposição neoplásica. In: Esteves JA, Baptista AP, Rodrigo FG, Gomes MM, eds. *Dermatologia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1992:820.
53. Ackerman AB. ABCDs? *Ackerman's resolving quandaries in Dermatology, Pathology and Dermatopathology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995:1-3.
54. Hantschke M. [Hypopigmented melanocytic tumors with spindle cells : A review.]. *Pathologie* 2007.
55. Massi G, LeBoit P. *Histological Diagnosis of Nevi and Melanoma*. Germany: Steinkopff Verlag Darmstadt, 2004.
56. Krieger N, Hiatt RA, Sagebiel RW, Clark WH, Jr., Mihm MC, Jr. Inter-observer variability among pathologists' evaluation of malignant melanoma: effects upon an analytic study. *J Clin Epidemiol* 1994;47:897-902.
57. Rogers GS, Advani H, Ackerman AB. A combined variant of Spitz's nevi. How to differentiate them from malignant melanomas. *Am J Dermatopathol* 1985;7 Suppl:61-78.
58. Massi G, LeBoit P. Criteria for the diagnosis of malignant melanoma. In: Massi G, LeBoit P, eds. *Histological Diagnosis of Nevi and Melanoma*. Germany: Steinkopff Verlag Darmstadt, 2004:385-402.
59. Aitken JF, Duffy DL, Green A, Youl P, MacLennan R, Martin NG. Heterogeneity of melanoma risk in families of melanoma patients. *Am J Epidemiol* 1994;140:961-73.
60. Elwood JM, Whitehead SM, Davison J, Stewart M, Galt M. Malignant melanoma in England: risks associated with naevi, freckles, social class, hair colour, and sunburn. *Int J Epidemiol* 1990;19:801-10.
61. Newton JA, Bataille V, Griffiths K *et al*. How common is the atypical mole syndrome phenotype in apparently sporadic melanoma? *J Am Acad Dermatol* 1993;29:989-96.
62. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 1988;124:869-71.
63. Gallagher RP, Elwood JM, Threlfall WJ, Spinelli JJ, Fincham S, Hill GB. Socioeconomic status, sunlight exposure, and risk of malignant melanoma: the Western Canada Melanoma Study. *J Natl Cancer Inst* 1987;79:647-52.

## BIBLIOGRAFIA

64. de Vries E, Bray F, Coeberg JW *et al.* Malignant melanoma. Introduction. In: LeBoit P, Burg G, Weedon D, Sarasin A, eds. *Pathology And Genetics of Skin Tumours*. Lyon: IARC Press, 2006:52-65.
65. Elder DE, Elenitsas R, Xu X. Benign pigmented lesions and malignant melanoma. In: Elder DE, Elenitsas R, Johnson BL, Murphy GF, Xu X, eds. *Lever's Histopathology of the skin*. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins, 2009:699-789.
66. Mooi WJ, Krausz T. *Pathology of Melanocytic Disorders*. Great Britain: Hodder Arnold, 2007.
67. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001;94:153-6.
68. Dobson AJ, Leeder SR. Mortality from malignant melanoma in Australia: effects due to country of birth. *Int J Epidemiol* 1982;11:207-11.
69. Cooke KR, Fraser J. Migration and death from malignant melanoma. *Int J Cancer* 1985;36:175-8.
70. Zanetti R, Franceschi S, Rosso S, Colonna S, Bidoli E. Cutaneous melanoma and sunburns in childhood in a southern European population. *Eur J Cancer* 1992;28A:1172-6.
71. Aitken JF, Green AC, MacLennan R, Youl P, Martin NG. The Queensland Familial Melanoma Project: study design and characteristics of participants. *Melanoma Res* 1996;6:155-65.
72. Begg CB. The search for cancer risk factors: when can we stop looking? *Am J Public Health* 2001;91:360-4.
73. Kremenz ET, Feed RJ, Coleman WP, III, Sutherland CM, Carter RD, Campbell M. Acral lentiginous melanoma. A clinicopathologic entity. *Ann Surg* 1982;195:632-45.
74. Takematsu H, Obata M, Tomita Y, Kato T, Takahashi M, Abe R. Subungual melanoma. A clinicopathologic study of 16 Japanese cases. *Cancer* 1985;55:2725-31.
75. Mohrle M, Hafner HM. Is subungual melanoma related to trauma? *Dermatology* 2002;204:259-61.
76. Ulusal BG, Karatas O, Yildiz AC, Oztan Y. Primary malignant melanoma of the maxillary gingiva. *Dermatol Surg* 2003;29:304-7.
77. Magnus K. Incidence of malignant melanoma of the skin in Norway, 1955-1970. Variations in time and space and solar radiation. *Cancer* 1973;32:1275-86.
78. Swerlick RA, Chen S. The melanoma epidemic: more apparent than real? *Mayo Clin Proc* 1997;72:559-64.
79. Osterlind A. Trends in incidence of ocular malignant melanoma in Denmark 1943-1982. *Int J Cancer* 1987;40:161-4.
80. Lee JA, Carter AP. Secular trends in mortality from malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1970;45:91-7.
81. Burton RC, Armstrong BK. Recent incidence trends imply a nonmetastasizing form of invasive melanoma. *Melanoma Res* 1994;4:107-13.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

82. Lipsker DM, Hedelin G, Heid E, Grosshans EM, Cribier BJ. Striking increase of thin melanomas contrasts with stable incidence of thick melanomas. *Arch Dermatol* 1999;135:1451-6.
83. Melia J, Moss S, Coleman D *et al*. The relation between mortality from malignant melanoma and early detection in the Cancer Research Campaign Mole Watcher Study. *Br J Cancer* 2001;85:803-7.
84. Dubow BE, Ackerman AB. Ideas in pathology. Malignant melanoma in situ: the evolution of a concept. *Mod Pathol* 1990;3:734-44.
85. Nestle FO, Halpern AC. Melanoma. In: Bologna J, Jorizzo J, Rapini RP, eds. *Dermatology*. Spain: Mosby Elsevier, 2008:1745-69.
86. Rapini RP. Melanocytic neoplasms. In: Rapini RP, ed. *Practical Dermatopathology*. China: Elsevier Mosby, 2005:261-79.
87. Banerjee SS, Harris M. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma. *Histopathology* 2000;36:387-402.
88. Leong AS, Cooper K, Leong FJ. *Manual of diagnostic antibodies for immunohistology*. London: Greenwich Medical Media Limited, 2003.
89. Daimaru Y, Hashimoto H, Enjoji M. Malignant peripheral nerve-sheath tumors (malignant schwannomas). An immunohistochemical study of 29 cases. *Am J Surg Pathol* 1985;9:434-44.
90. Chang KL, Folpe AL. Diagnostic utility of microphthalmia transcription factor in malignant melanoma and other tumors. *Adv Anat Pathol* 2001;8:273-5.
91. Xu X, Chu AY, Pasha TL, Elder DE, Zhang PJ. Immunoprofile of MITF, tyrosinase, melan-A, and MAGE-1 in HMB45-negative melanomas. *Am J Surg Pathol* 2002;26:82-7.
92. Nakajima T, Watanabe S, Sato Y, Kameya T, Hirota T, Shimosato Y. An immunoperoxidase study of S-100 protein distribution in normal and neoplastic tissues. *Am J Surg Pathol* 1982;6:715-27.
93. Loeffel SC, Gillespie GY, Mirmiran SA *et al*. Cellular immunolocalization of S100 protein within fixed tissue sections by monoclonal antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109:117-22.
94. Dabbs DJ. *Diagnostic immunohistochemistry*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2002.
95. Fernando SS, Johnson S, Bate J. Immunohistochemical analysis of cutaneous malignant melanoma: comparison of S-100 protein, HMB-45 monoclonal antibody and NKI/C3 monoclonal antibody. *Pathology* 1994;26:16-9.
96. Bishop PW, Menasce LP, Yates AJ, Win NA, Banerjee SS. An immunophenotypic survey of malignant melanomas. *Histopathology* 1993;23:159-66.
97. Kaufmann O, Koch S, Burghardt J, Audring H, Dietel M. Tyrosinase, melan-A, and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. *Mod Pathol* 1998;11:740-6.
98. Cochran AJ, Wen DR. S-100 protein as a marker for melanocytic and other tumours. *Pathology* 1985;17:340-5.

## BIBLIOGRAFIA

99. McKee PH, Calonje E, Granter SR. Melanoma. *Pathology of the skin with clinical correlations*. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2009:1309-56.
100. Frisman, DM. Immunohistochemistry Literature Database. Query Sistem. <http://www.immunoquery.com>, July 15. 2005.
101. Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol* 2008;35:433-44.
102. Kaneishi NK, Cockerell CJ. Histologic differentiation of desmoplastic melanoma from cicatrices. *Am J Dermatopathol* 1998;20:128-34.
103. Robson A, Allen P, Hollowood K. S100 expression in cutaneous scars: a potential diagnostic pitfall in the diagnosis of desmoplastic melanoma. *Histopathology* 2001;38:135-40.
104. Chorny JA, Barr RJ. S100-positive spindle cells in scars: a diagnostic pitfall in the re-excision of desmoplastic melanoma. *Am J Dermatopathol* 2002;24:309-12.
105. Ribe A, McNutt NS. S100A6 protein expression is different in Spitz nevi and melanomas. *Mod Pathol* 2003;16:505-11.
106. Banfalvi T, Udvarhelyi N, Orosz Z, Gergye M, Gilde K, Timar J. Heterogenous S-100B protein expression patterns in malignant melanoma and association with serum protein levels. *Oncology* 2003;64:374-9.
107. Bottoni U, Izzo P, Richetta A *et al.* S100 serum level: a tumour marker for metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2003;13:427-9.
108. McKee PH, Calonje E, Granter SR. *Pathology of the skin with clinical correlations*. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005.
109. Ordonez NG, Ji XL, Hickey RC. Comparison of HMB-45 monoclonal antibody and S-100 protein in the immunohistochemical diagnosis of melanoma. *Am J Clin Pathol* 1988;90:385-90.
110. Wick MR, Swanson PE, Rocamora A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. *J Cutan Pathol* 1988;15:201-7.
111. Orchard GE. Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J* 2000;32:475-81.
112. Clarkson KS, Sturdgess IC, Molyneux AJ. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan-A). *J Clin Pathol* 2001;54:196-200.
113. Sundram U, Harvell JD, Rouse RV, Natkunam Y. Expression of the B-cell proliferation marker MUM1 by melanocytic lesions and comparison with S100, gp100 (HMB45), and MelanA. *Mod Pathol* 2003;16:802-10.
114. Zubovits J, Buzney E, Yu L, Duncan LM. HMB-45, S-100, NK1/C3, and MART-1 in metastatic melanoma. *Hum Pathol* 2004;35:217-23.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

115. Argani P, Lae M, Hutchinson B *et al.* Renal carcinomas with the t(6;11)(p21;q12): clinicopathologic features and demonstration of the specific alpha-TFEB gene fusion by immunohistochemistry, RT-PCR, and DNA PCR. *Am J Surg Pathol* 2005;29:230-40.
116. Fetsch PA, Marincola FM, Abati A. The new melanoma markers: MART-1 and Melan-A (the NIH experience). *Am J Surg Pathol* 1999;23:607-10.
117. Busam KJ, Jungbluth AA. Melan-A, a new melanocytic differentiation marker. *Adv Anat Pathol* 1999;6:12-8.
118. Mentzel T, Reissbauer S, Rutten A, Hantschke M, Soares de Almeida LM, Kutzner H. Cutaneous clear cell myomelanocytic tumour: a new member of the growing family of perivascular epithelioid cell tumours (PEComas). Clinicopathological and immunohistochemical analysis of seven cases. *Histopathology* 2005;46:498-504.
119. Dim DC, Cooley LD, Miranda RN. Clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses: a review. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:152-6.
120. Jungbluth AA, Busam KJ, Gerald WL *et al.* A103: An anti-melan-a monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. *Am J Surg Pathol* 1998;22:595-602.
121. Shabrawi-Caelen L, Kerl H, Cerroni L. Melan-A: not a helpful marker in distinction between melanoma in situ on sun-damaged skin and pigmented actinic keratosis. *Am J Dermatopathol* 2004;26:364-6.
122. Hofbauer GF, Kamarashev J, Geertsen R, Boni R, Dummer R. Tyrosinase immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *J Cutan Pathol* 1998;25:204-9.
123. Miettinen M, Fernandez M, Franssila K, Gatalica Z, Lasota J, Sarlomo-Rikala M. Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical diagnosis of metastatic melanoma: comparison with four other melanoma markers. *Am J Surg Pathol* 2001;25:205-11.
124. Jungbluth AA, Iversen K, Coplan K *et al.* T311--an anti-tyrosinase monoclonal antibody for the detection of melanocytic lesions in paraffin embedded tissues. *Pathol Res Pract* 2000;196:235-42.
125. Makhlof HR, Ishak KG, Shekar R, Sesterhenn IA, Young DY, Fanburg-Smith JC. Melanoma markers in angiomyolipoma of the liver and kidney: a comparative study. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:49-55.
126. Boyle JL, Haupt HM, Stern JB, Multhaupt HA. Tyrosinase expression in malignant melanoma, desmoplastic melanoma, and peripheral nerve tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:816-22.
127. Granter SR, Weilbaecher KN, Quigley C, Fisher DE. Role for microphthalmia transcription factor in the diagnosis of metastatic malignant melanoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10:47-51.
128. King R, Googe PB, Weilbaecher KN, Mihm MC, Jr., Fisher DE. Microphthalmia transcription factor expression in cutaneous benign, malignant melanocytic, and nonmelanocytic tumors. *Am J Surg Pathol* 2001;25:51-7.

## BIBLIOGRAFIA

129. King R, Weilbaecher KN, McGill G, Cooley E, Mihm M, Fisher DE. Microphthalmia transcription factor. A sensitive and specific melanocyte marker for MelanomaDiagnosis. *Am J Pathol* 1999;155:731-8.
130. Busam KJ, Iversen K, Coplan KC, Jungbluth AA. Analysis of microphthalmia transcription factor expression in normal tissues and tumors, and comparison of its expression with S-100 protein, gp100, and tyrosinase in desmoplastic malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 2001;25:197-204.
131. Taylor ML, Metcalfe DD. Kit signal transduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000;14:517-35.
132. Potti A, Hille RC, Koch M. Immunohistochemical determination of HER-2/neu overexpression in malignant melanoma reveals no prognostic value, while c-Kit (CD117) overexpression exhibits potential therapeutic implications. *J Carcinog* 2003;2:8.
133. Potti A, Moazzam N, Langness E *et al.* Immunohistochemical determination of HER-2/neu, c-Kit (CD117), and vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpression in malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:80-6.
134. Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol* 1998;11:728-34.
135. Joensuu H, Dimitrijevic S. Tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) as an anticancer agent for solid tumours. *Ann Med* 2001;33:451-5.
136. Lemm D, Muegge LO, Hoeffken K *et al.* Remission with Imatinib mesylate treatment in a patient with initially unresectable dermatofibrosarcoma protuberans--a case report. *Oral Maxillofac Surg* 2008;12:209-13.
137. Lemm D, Muegge LO, Mentzel T, Hoffken K. Current treatment options in dermatofibrosarcoma protuberans. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:653-65.
138. Kanik AB, Yaar M, Bhawan J. p75 nerve growth factor receptor staining helps identify desmoplastic and neurotropic melanoma. *J Cutan Pathol* 1996;23:205-10.
139. Iwamoto S, Burrows RC, Agoff SN, Piepkorn M, Bothwell M, Schmidt R. The p75 neurotrophin receptor, relative to other Schwann cell and melanoma markers, is abundantly expressed in spindled melanomas. *Am J Dermatopathol* 2001;23:288-94.
140. Fanburg-Smith JC, Miettinen M. Low-affinity nerve growth factor receptor (p75) in dermatofibrosarcoma protuberans and other nonneural tumors: a study of 1,150 tumors and fetal and adult normal tissues. *Hum Pathol* 2001;32:976-83.
141. Vennegoor C, Calafat J, Hageman P *et al.* Biochemical characterization and cellular localization of a formalin-resistant melanoma-associated antigen reacting with monoclonal antibody NKI/C-3. *Int J Cancer* 1985;35:287-95.
142. Mackie RM, Campbell I, Turbitt ML. Use of NK1 C3 monoclonal antibody in the assessment of benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol* 1984;37:367-72.
143. Orchard G, Wilson JE. Immunocytochemistry in the diagnosis of malignant melanoma. *Br J Biomed Sci* 1994;51:44-56.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

144. Salazar-Onfray F, Lopez M, Lundqvist A *et al.* Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *Br J Cancer* 2002;87:414-22.
145. Trefzer U, Rietz N, Chen Y *et al.* SM5-1: a new monoclonal antibody which is highly sensitive and specific for melanocytic lesions. *Arch Dermatol Res* 2000;292:583-9.
146. Busam KJ, Kucukgol D, Sato E, Frosina D, Teruya-Feldstein J, Jungbluth AA. Immunohistochemical analysis of novel monoclonal antibody PNL2 and comparison with other melanocyte differentiation markers. *Am J Surg Pathol* 2005;29:400-6.
147. de Wit NJ, Van Muijen GN, Ruiter DJ. Immunohistochemistry in melanocytic proliferative lesions. *Histopathology* 2004;44:517-41.
148. Wilsher M, Cheerala B. WT1 as a complementary marker of malignant melanoma: an immunohistochemical study of whole sections. *Histopathology* 2007;51:605-10.
149. Li LX, Crotty KA, McCarthy SW, Palmer AA, Kril JJ. A zonal comparison of MIB1-Ki67 immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 2000;22:489-95.
150. Okun MR, Edelstein LM, Kasznica J, Kirkham N, Slater DN. What criteria reliably distinguish melanoma from benign melanocytic lesions? *Histopathology* 2000;37:464-72.
151. Ramsay JA, From L, Iscoe NA, Kahn HJ. MIB-1 proliferative activity is a significant prognostic factor in primary thick cutaneous melanomas. *J Invest Dermatol* 1995;105:22-6.
152. Boni R, Doguoglu A, Burg G, Muller B, Dummer R. MIB-1 immunoreactivity correlates with metastatic dissemination in primary thick cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1996;35:416-8.
153. Frahm SO, Schubert C, Parwaresch R, Rudolph P. High proliferative activity may predict early metastasis of thin melanomas. *Hum Pathol* 2001;32:1376-81.
154. Hazan C, Melzer K, Panageas KS *et al.* Evaluation of the proliferation marker MIB-1 in the prognosis of cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 2002;95:634-40.
155. Henrique R, Azevedo R, Bento MJ, Domingues JC, Silva C, Jeronimo C. Prognostic value of Ki-67 expression in localized cutaneous malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2000;43:991-1000.
156. Moretti S, Spallanzani A, Chiarugi A, Fabiani M, Pinzi C. Correlation of Ki-67 expression in cutaneous primary melanoma with prognosis in a prospective study: different correlation according to thickness. *J Am Acad Dermatol* 2001;44:188-92.
157. Fujita T, Doihara H, Kawasaki K *et al.* PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer. *Br J Cancer* 2006;94:247-52.
158. Mu XC, Tran TA, Ross JS, Carlson JA. Topoisomerase II-alpha expression in melanocytic nevi and malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 2000;27:242-8.
159. Florenes VA, Maelandsmo GM, Faye R, Nesland JM, Holm R. Cyclin A expression in superficial spreading malignant melanomas correlates with clinical outcome. *J Pathol* 2001;195:530-6.

## BIBLIOGRAFIA

160. Tran TA, Ross JS, Carlson JA, Mihm MC, Jr. Mitotic cyclins and cyclin-dependent kinases in melanocytic lesions. *Hum Pathol* 1998;29:1085-90.
161. Alonso SR, Ortiz P, Pollan M *et al.* Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol* 2004;164:193-203.
162. Florenes VA, Faye RS, Maelandsmo GM, Nesland JM, Holm R. Levels of cyclin D1 and D3 in malignant melanoma: deregulated cyclin D3 expression is associated with poor clinical outcome in superficial melanoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:3614-20.
163. Walker G, Hayward N. No evidence of a role for activating CDK2 mutations in melanoma. *Melanoma Res* 2001;11:343-8.
164. Du J, Widlund HR, Horstmann MA *et al.* Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* 2004;6:565-76.
165. Wang YL, Uhara H, Yamazaki Y, Nikaido T, Saida T. Immunohistochemical detection of CDK4 and p16INK4 proteins in cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 1996;134:269-75.
166. Bales ES, Dietrich C, Bandyopadhyay D *et al.* High levels of expression of p27KIP1 and cyclin E in invasive primary malignant melanomas. *J Invest Dermatol* 1999;113:1039-46.
167. Straume O, Akslen LA. Alterations and prognostic significance of p16 and p53 protein expression in subgroups of cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 1997;74:535-9.
168. Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:1845-53.
169. Maelandsmo GM, Florenes VA, Hovig E *et al.* Involvement of the pRb/p16/cdk4/cyclin D1 pathway in the tumorigenesis of sporadic malignant melanomas. *Br J Cancer* 1996;73:909-16.
170. Talve L, Sauroja I, Collan Y, Punnonen K, Ekfors T. Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *Int J Cancer* 1997;74:255-9.
171. Mihic-Probst D, Saremaslani P, Komminoth P, Heitz PU. Immunostaining for the tumour suppressor gene p16 product is a useful marker to differentiate melanoma metastasis from lymph-node nevus. *Virchows Arch* 2003;443:745-51.
172. Piepkorn M. Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:705-22.
173. Greene MH. The genetics of hereditary melanoma and nevi. 1998 update. *Cancer* 1999;86:2464-77.
174. Hayashi Y. [Mechanism of tumorigenesis caused by tumor suppressor gene]. *Nippon Rinsho* 2000;58:1231-6.
175. Sparrow LE, Eldon MJ, English DR, Heenan PJ. p16 and p21WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *Am J Dermatopathol* 1998;20:255-61.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

176. Maelandsmo GM, Holm R, Fodstad O, Kerbel RS, Florenes VA. Cyclin kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in malignant melanoma: reduced expression in metastatic lesions. *Am J Pathol* 1996;149:1813-22.
177. Trotter MJ, Tang L, Tron VA. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) in human cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 1997;24:265-71.
178. Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 2006;355:1037-46.
179. El Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817-25.
180. Ivan D, Diwan AH, Esteva FJ, Prieto VG. Expression of cell cycle inhibitor p27Kip1 and its inactivator Jab1 in melanocytic lesions. *Mod Pathol* 2004;17:811-8.
181. Morgan MB, Cowper SE. Expression of p-27 (kip1) in nevi and melanomas. *Am J Dermatopathol* 1999;21:121-4.
182. Florenes VA, Maelandsmo GM, Kerbel RS, Slingerland JM, Nesland JM, Holm R. Protein expression of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in malignant melanoma: inverse correlation with disease-free survival. *Am J Pathol* 1998;153:305-12.
183. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R. *Robbins Basic Pathology*. China: Saunders Elsevier, 2007.
184. Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol* 2005;23:1473-82.
185. Dhawan P, Singh AB, Ellis DL, Richmond A. Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappaB and tumor progression. *Cancer Res* 2002;62:7335-42.
186. Teresi RE, Zbuk KM, Pezzolesi MG, Waite KA, Eng C. Cowden syndrome-affected patients with PTEN promoter mutations demonstrate abnormal protein translation. *Am J Hum Genet* 2007;81:756-67.
187. Ruderman JV. MAP kinase and the activation of quiescent cells. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:207-13.
188. Davies H, Bignell GR, Cox C *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54.
189. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM *et al.* Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004;116:855-67.
190. Hingorani SR, Jacobetz MA, Robertson GP, Herlyn M, Tuveson DA. Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer Res* 2003;63:5198-202.
191. Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D *et al.* V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res* 2004;64:2338-42.

## BIBLIOGRAFIA

192. Sharma A, Trivedi NR, Zimmerman MA, Tuveson DA, Smith CD, Robertson GP. Mutant V599E-BRAF regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res* 2005;65:2412-21.
193. Haluska FG, Tsao H, Wu H, Haluska FS, Lazar A, Goel V. Genetic alterations in signaling pathways in melanoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:2301s-7s.
194. Davison JM, Rosenbaum E, Barrett TL *et al.* Absence of V599E BRAF mutations in desmoplastic melanomas. *Cancer* 2005;103:788-92.
195. Fullen DR, Poynter JN, Lowe L *et al.* BRAF and NRAS mutations in spitzoid melanocytic lesions. *Mod Pathol* 2006;19:1324-32.
196. Saenz-Santamaria MC, McNutt NS, Bogdany JK, Shea CR. p53 expression is rare in cutaneous melanomas. *Am J Dermatopathol* 1995;17:344-9.
197. Talve L, Kainu J, Collan Y, Ekfors T. Immunohistochemical expression of p53 protein, mitotic index and nuclear morphometry in primary malignant melanoma of the skin. *Pathol Res Pract* 1996;192:825-33.
198. Korabiowska M, Brinck U, Hoenig JF *et al.* Significance of P-53 antigen in malignant melanomas and naevi of the head and neck area. *Anticancer Res* 1995;15:885-9.
199. Chorny JA, Barr RJ, Kyshtoobayeva A, Jakowatz J, Reed RJ. Ki-67 and p53 expression in minimal deviation melanomas as compared with other nevomelanocytic lesions. *Mod Pathol* 2003;16:525-9.
200. Polsky D, Bastian BC, Hazan C *et al.* HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2001;61:7642-6.
201. Polsky D, Melzer K, Hazan C *et al.* HDM2 protein overexpression and prognosis in primary malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1803-6.
202. Korabiowska M, Betke H, Kellner S, Stachura J, Schauer A. Differential expression of growth arrest, DNA damage genes and tumour suppressor gene p53 in naevi and malignant melanomas. *Anticancer Res* 1997;17:3697-700.
203. Rieger E, Hofmann-Wellenhof R, Soyer HP *et al.* Comparison of proliferative activity as assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 monoclonal antibodies in melanocytic skin lesions. A quantitative immunohistochemical study. *J Cutan Pathol* 1993;20:229-36.
204. Niemann TH, Argenyi ZB. Immunohistochemical study of Spitz nevi and malignant melanoma with use of antibody to proliferating cell nuclear antigen. *Am J Dermatopathol* 1993;15:441-5.
205. Niezabitowski A, Czajeki K, Rys J *et al.* Prognostic evaluation of cutaneous malignant melanoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *J Surg Oncol* 1999;70:150-60.
206. Reddy VB, Gattuso P, Aranha G, Carson HJ. Cell proliferation markers in predicting metastases in malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 1995;22:248-51.
207. Woosley JT, Dietrich DR. Prognostic significance of PCNA grade in malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 1993;20:498-503.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

208. Imonen S, Vaheri A, Asko-Seljavaara S, Carpen O. Ezrin in primary cutaneous melanoma. *Mod Pathol* 2005;18:503-10.
209. Villanueva J, Herlyn M. Melanoma and the tumor microenvironment. *Curr Oncol Rep* 2008;10:439-46.
210. Smolle J, Hofmann-Wellenhof R, Fink-Puches R. Melanoma and stroma: an interaction of biological and prognostic importance. *Semin Cutan Med Surg* 1996;15:326-35.
211. Cowley GP, Smith ME. Cadherin expression in melanocytic naevi and malignant melanomas. *J Pathol* 1996;179:183-7.
212. Andersen K, Nesland JM, Holm R, Florenes VA, Fodstad O, Maelandsmo GM. Expression of S100A4 combined with reduced E-cadherin expression predicts patient outcome in malignant melanoma. *Mod Pathol* 2004;17:990-7.
213. Kefeli M, Yildiz L, Kaya FC, Aydin O, Kandemir B. Fascin expression in uterine smooth muscle tumors. *Int J Gynecol Pathol* 2009;28:328-33.
214. Fontijn D, Duyndam MC, van Berkel MP *et al.* CD13/Aminopeptidase N overexpression by basic fibroblast growth factor mediates enhanced invasiveness of 1F6 human melanoma cells. *Br J Cancer* 2006;94:1627-36.
215. Saiki I, Fujii H, Yoneda J *et al.* Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int J Cancer* 1993;54:137-43.
216. Folpe AL, Cooper K. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: pleomorphic cutaneous spindle cell tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:1517-24.
217. Greaves MF, Brown J, Molgaard HV *et al.* Molecular features of CD34: a hemopoietic progenitor cell-associated molecule. *Leukemia* 1992;6 Suppl 1:31-6.
218. Kutzner H. Expression of the human progenitor cell antigen CD34 (HPCA-1) distinguishes dermatofibrosarcoma protuberans from fibrous histiocytoma in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:613-7.
219. Weiss SW, Nickoloff BJ. CD-34 is expressed by a distinctive cell population in peripheral nerve, nerve sheath tumors, and related lesions. *Am J Surg Pathol* 1993;17:1039-45.
220. Baer SC, Casaubon L, Younes M. Expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in cutaneous neoplasia. *J Am Acad Dermatol* 1997;37:575-7.
221. Folpe AL, Billings SD, McKenney JK, Walsh SV, Nusrat A, Weiss SW. Expression of claudin-1, a recently described tight junction-associated protein, distinguishes soft tissue perineurioma from potential mimics. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1620-6.
222. Kageshita T, Hirai S, Ono T, Hicklin DJ, Ferrone S. Down-regulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. *Am J Pathol* 1999;154:745-54.
223. Ruiter DJ, Bergman W, Welvaart K *et al.* Immunohistochemical analysis of malignant melanomas and nevocellular nevi with monoclonal antibodies to distinct monomorphic determinants of HLA antigens. *Cancer Res* 1984;44:3930-5.

## BIBLIOGRAFIA

224. Ericsson C, Seregard S, Bartolazzi A *et al.* Association of HLA class I and class II antigen expression and mortality in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2153-6.
225. van den Oord JJ, Maes A, Stas M *et al.* CD40 is a prognostic marker in primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* 1996;149:1953-61.
226. van den Oord JJ. Expression of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in benign and malignant pigment-cell lesions of the skin. *Br J Dermatol* 1998;138:615-21.
227. Luftl M, Schuler G, Jungbluth AA. Melanoma or not? Cancer testis antigens may help. *Br J Dermatol* 2004;151:1213-8.
228. Sheffield MV, Yee H, Dorvault CC *et al.* Comparison of five antibodies as markers in the diagnosis of melanoma in cytologic preparations. *Am J Clin Pathol* 2002;118:930-6.
229. Blessing K, Sanders DS, Grant JJ. Comparison of immunohistochemical staining of the novel antibody melan-A with S100 protein and HMB-45 in malignant melanoma and melanoma variants. *Histopathology* 1998;32:139-46.
230. Carlson JA, Dickersin GR, Sober AJ, Barnhill RL. Desmoplastic neurotropic melanoma. A clinicopathologic analysis of 28 cases. *Cancer* 1995;75:478-94.
231. Bergman R, Malkin L, Sabo E, Kerner H. MIB-1 monoclonal antibody to determine proliferative activity of Ki-67 antigen as an adjunct to the histopathologic differential diagnosis of Spitz nevi. *J Am Acad Dermatol* 2001;44:500-4.
232. Seykora JT, Jih D, Elenitsas R, Horng WH, Elder DE. Gene expression profiling of melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 2003;25:6-11.
233. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ *et al.* Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19:3635-48.
234. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE *et al.* Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001;19:3622-34.
235. Garnier JP, Letellier S, Cassinat B *et al.* Clinical value of combined determination of plasma L-DOPA/tyrosine ratio, S100B, MIA and LDH in melanoma. *Eur J Cancer* 2007;43:816-21.
236. Heenan PJ, Taran JM. Metastasizing thin melanoma or multiple primary melanomas? *Arch Dermatol* 2003;139:388-9.
237. Moloney DM, Gordon DJ, Briggs JC, Rigby HS. Recurrence of thin melanoma: how effective is follow-up? *Br J Plast Surg* 1996;49:409-13.
238. Elder D. *Lever's Histopathology of the skin*. Philadelphia (PA): 2009.
239. Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry D *et al.* Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1893-904.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

240. Balch CM, Soong S, Ross MI *et al.* Long-term results of a multi-institutional randomized trial comparing prognostic factors and surgical results for intermediate thickness melanomas (1.0 to 4.0 mm). Intergroup Melanoma Surgical Trial. *Ann Surg Oncol* 2000;7:87-97.
241. Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969;29:705-27.
242. Rogers GS, Kopf AW, Rigel DS *et al.* Influence of anatomic location on prognosis of malignant melanoma: attempt to verify the BANS model. *J Am Acad Dermatol* 1986;15:231-7.
243. Weinstock MA, Morris BT, Lederman JS, Bleicher P, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Effect of BANS location on the prognosis of clinical stage I melanoma: new data and meta-analysis. *Br J Dermatol* 1988;119:559-65.
244. Bernengo MG, Reali UM, Doveil GC, Cappello N, Lisa F, Moretti S. BANS: a discussion of the problem. *Melanoma Res* 1992;2:157-62.
245. Balch CM. Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. *Semin Surg Oncol* 1992;8:400-14.
246. Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. *Mod Pathol* 2006;19 Suppl 2:S71-S87.
247. Payette MJ, Katz M, III, Grant-Kels JM. Melanoma prognostic factors found in the dermatopathology report. *Clin Dermatol* 2009;27:53-74.
248. Kirkham N, Cotton DW. Measuring melanomas: the Vernier method. *J Clin Pathol* 1984;37:229-30.
249. Bedrosian I, Faries MB, Guerry D *et al.* Incidence of sentinel node metastasis in patients with thin primary melanoma ( $\leq 1$  mm) with vertical growth phase. *Ann Surg Oncol* 2000;7:262-7.
250. Massi D, Franchi A, Santucci M. Prognostic factors in thin cutaneous malignant melanoma. *Pathologica* 2002;94:282-9.
251. Ruiter DJ, Spatz A, van den Oord JJ, Cook MG. Pathologic staging of melanoma. *Semin Oncol* 2002;29:370-81.
252. Vihinen PP, Pyrhonen SO, Kahari VM. New prognostic factors and developing therapy of cutaneous melanoma. *Ann Med* 2003;35:66-78.
253. Cook MG, Spatz A, Brocker EB, Ruiter DJ. Identification of histological features associated with metastatic potential in thin ( $<1.0$  mm) cutaneous melanoma with metastases. A study on behalf of the EORTC Melanoma Group. *J Pathol* 2002;197:188-93.
254. Day CL, Jr., Lew RA, Harrist TJ. Malignant melanoma prognostic factors 4: ulceration width. *J Dermatol Surg Oncol* 1984;10:23-4.
255. Kesmodel SB, Karakousis GC, Botbyl JD *et al.* Mitotic rate as a predictor of sentinel lymph node positivity in patients with thin melanomas. *Ann Surg Oncol* 2005;12:449-58.

## BIBLIOGRAFIA

256. Clemente CG, Mihm MC, Jr., Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996;77:1303-10.
257. Mihm MC, Jr., Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest* 1996;74:43-7.
258. Hernberg M, Turunen JP, Muhonen T, Pyrhonen S. Tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma receiving chemoimmunotherapy. *J Immunother* 1997;20:488-95.
259. Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR, III. Vascular involvement in the prognosis of primary cutaneous melanoma. *Arch Dermatol* 2001;137:1169-73.
260. Borgstein PJ, Meijer S, van Diest PJ. Are locoregional cutaneous metastases in melanoma predictable? *Ann Surg Oncol* 1999;6:315-21.
261. Newlin HE, Morris CG, Amdur RJ, Mendenhall WM. Neurotropic melanoma of the head and neck with clinical perineural invasion. *Am J Clin Oncol* 2005;28:399-402.
262. McCarthy SW, Scolyer RA, Palmer AA. Desmoplastic melanoma: a diagnostic trap for the unwary. *Pathology* 2004;36:445-51.
263. Chang PC, Fischbein NJ, McCalmont TH *et al.* Perineural spread of malignant melanoma of the head and neck: clinical and imaging features. *AJNR Am J Neuroradiol* 2004;25:5-11.
264. Gentile RD, Donovan DT. Neurotropic melanoma of the head and neck. *Laryngoscope* 1985;95:1161-6.
265. Harrist TJ, Rigel DS, Day CL, Jr. *et al.* "Microscopic satellites" are more highly associated with regional lymph node metastases than is primary melanoma thickness. *Cancer* 1984;53:2183-7.
266. Leon P, Daly JM, Synnestvedt M, Schultz DJ, Elder DE, Clark WH, Jr. The prognostic implications of microscopic satellites in patients with clinical stage I melanoma. *Arch Surg* 1991;126:1461-8.
267. Conley J, Lattes R, Orr W. Desmoplastic malignant melanoma (a rare variant of spindle cell melanoma). *Cancer* 1971;28:914-36.
268. Reed RJ, Leonard DD. Neurotropic melanoma. A variant of desmoplastic melanoma. *Am J Surg Pathol* 1979;3:301-11.
269. Chen JY, Hruby G, Scolyer RA *et al.* Desmoplastic neurotropic melanoma: a clinicopathologic analysis of 128 cases. *Cancer* 2008;113:2770-8.
270. Sutula FC, Dortzbach RK, Bolles JC. Desmoplastic malignant melanoma of the upper eyelid. *Ann Ophthalmol* 1982;14:141-3.
271. Roper JP, Jones T, Common JD. Desmoplastic malignant melanoma masquerading as chalazion. *Br J Ophthalmol* 1986;70:907-10.
272. Shields JA, Joffe L, Guibor P. Choroidal melanoma clinically simulating a retinal angioma. *Am J Ophthalmol* 1978;85:67-71.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

273. Ellis M, Drewe R, O'Day J. Desmoplastic malignant melanoma presenting with orbital involvement. *Aust N Z J Ophthalmol* 1994;22:119-23.
274. Dumortier R, Cruel T, Leroy X, Cariou JL, Bellavoire A. [Desmoplastic malignant melanoma of the ear. A case report]. *Ann Chir Plast Esthet* 1997;42:329-32.
275. Jennings TA, Okby NT, Schroer KR, Wolf BC, Mihm MC, Jr. Parotid involvement by desmoplastic melanoma. *Histopathology* 1996;29:165-70.
276. Chan GS, Choy C, Ng WK, Chan KW. Desmoplastic malignant melanoma on the buttock of an 18-year-old girl: differentiation from desmoplastic nevus. *Am J Dermatopathol* 1999;21:170-3.
277. Kilpatrick SE, White WL, Browne JD. Desmoplastic malignant melanoma of the oral mucosa. An underrecognized diagnostic pitfall. *Cancer* 1996;78:383-9.
278. Hui JI, Linden KG, Barr RJ. Desmoplastic malignant melanoma of the lip: a report of 6 cases and review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 2002;47:863-8.
279. Dickhaus DM, Schuller D. Desmoplastic malignant melanoma presenting as a lung mass. *Chest* 1996;110:570-1.
280. Quinn MJ, Crotty KA, Thompson JF, Coates AS, O'Brien CJ, McCarthy WH. Desmoplastic and desmoplastic neurotropic melanoma: experience with 280 patients. *Cancer* 1998;83:1128-35.
281. Posther KE, Selim MA, Mosca PJ *et al.* Histopathologic characteristics, recurrence patterns, and survival of 129 patients with desmoplastic melanoma. *Ann Surg Oncol* 2006;13:728-39.
282. Skelton HG, Smith KJ, Laskin WB *et al.* Desmoplastic malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1995;32:717-25.
283. Rutten A, Hugel H, Kutzner H, Schirren CG, Kuchler A, Groth W. Das desmoplastische maligne Melanom Klinische und histopathologische Ergebnisse einer Studie von 34 Patienten [Desmoplastic malignant melanoma. Clinical and histopathologic results of a study in 34 patients]. *Hautarzt* 1996;47:447-53.
284. Carlson JA, Egbert BM. Desmoplastic neurotropic malignant melanoma. *Pathology (Phila)* 1994;2:339-57.
285. Lens MB, Newton-Bishop JA, Boon AP. Desmoplastic malignant melanoma: a systematic review. *Br J Dermatol* 2005;152:673-8.
286. Jaroszewski DE, Pockaj BA, DiCaudo DJ, Bite U. The clinical behavior of desmoplastic melanoma. *Am J Surg* 2001;182:590-5.
287. Thelmo MC, Sagebiel RW, Treseler PA *et al.* Evaluation of sentinel lymph node status in spindle cell melanomas. *J Am Acad Dermatol* 2001;44:451-5.
288. Gyorki DE, Busam K, Panageas K, Brady MS, Coit DG. Sentinel lymph node biopsy for patients with cutaneous desmoplastic melanoma. *Ann Surg Oncol* 2003;10:403-7.
289. Cummins DL, Esche C, Barrett TL, Balch CM, Mofid M. Lymph node biopsy results for desmoplastic malignant melanoma. *Cutis* 2007;79:390-4.

## BIBLIOGRAFIA

290. Su LD, Fullen DR, Lowe L *et al.* Desmoplastic and neurotropic melanoma. *Cancer* 2004;100:598-604.
291. Mahendran RM, Newton-Bishop JA. Survey of U.K. current practice in the treatment of lentigo maligna. *Br J Dermatol* 2001;144:71-6.
292. Prasad ML, Patel SG, Busam KJ. Primary mucosal desmoplastic melanoma of the head and neck. *Head Neck* 2004;26:373-7.
293. Rongioletti F, Gambini C, Semino MT, Rebora A. [Desmoplastic and neurotropic subungueal melanoma]. *Ann Dermatol Venereol* 1995;122:707-10.
294. Cozar IA, Jimenez VJ, del Olmo EM, Gomez Alvarez De Luna JL. [Subungueal amelanotic melanoma]. *Rev Clin Esp* 2001;201:673-4.
295. Massi G, LeBoit P. Desmoplastic melanoma. In: Massi G, LeBoit P, eds. *Histological Diagnosis of Nevi and Melanoma*. Germany: Steinkopff Verlag Darmstadt, 2004:488-91.
296. Ackerman AB, Godomski J. Neurotropic malignant melanoma and other neurotropic neoplasms in the skin. *Am J Dermatopathol* 1984;6 Suppl:63-80.
297. Kossard S, Doherty E, Murray E. Neurotropic Melanoma. A variant of desmoplastic melanoma. *Arch Dermatol* 1987;123:907-12.
298. Smithers BM, McLeod GR, Little JH. Desmoplastic, neural transforming and neurotropic melanoma: a review of 45 cases. *Aust N Z J Surg* 1990;60:967-72.
299. Walsh NM, Roberts JT, Orr W, Simon GT. Desmoplastic malignant melanoma. A clinicopathologic study of 14 cases. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:922-7.
300. Lucas DR, Tazelaar HD, Unni KK *et al.* Osteogenic melanoma. A rare variant of malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 1993;17:400-9.
301. Emanuel PO, Idrees MT, Leytin A, Kwon EJ, Phelps RG. Aggressive osteogenic desmoplastic melanoma: a case report. *J Cutan Pathol* 2007;34:423-6.
302. Moreno A, Lamarca J, Martinez R, Guix M. Osteoid and bone formation in desmoplastic malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 1986;13:128-34.
303. Livestro DP, Muzikansky A, Kaine EM *et al.* Biology of desmoplastic melanoma: a case-control comparison with other melanomas. *J Clin Oncol* 2005;23:6739-46.
304. Shendrik I, Silvers DN. Desmoplastic and desmoplastic neurotropic melanoma: experience with 280 patients. *Cancer* 1999;85:2491-2.
305. Busam KJ, Zhao H, Coit DG *et al.* Distinction of desmoplastic melanoma from non-desmoplastic melanoma by gene expression profiling. *J Invest Dermatol* 2005;124:412-8.
306. Xu X, Zhang PJ, Elder DE. Tyrosinase expression in malignant melanoma, desmoplastic melanoma, and peripheral nerve tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:1083-4.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

307. Koch MB, Shih IM, Weiss SW, Folpe AL. Microphthalmia transcription factor and melanoma cell adhesion molecule expression distinguish desmoplastic/spindle cell melanoma from morphologic mimics. *Am J Surg Pathol* 2001;25:58-64.
308. Granter SR, Weilbaecher KN, Quigley C, Fletcher CD, Fisher DE. Microphthalmia transcription factor: not a sensitive or specific marker for the diagnosis of desmoplastic melanoma and spindle cell (non-desmoplastic) melanoma. *Am J Dermatopathol* 2001;23:185-9.
309. King R, Googe PB, Weilbaecher KN, Mihm MC, Jr., Fisher DE. Microphthalmia transcription factor expression in cutaneous benign, malignant melanocytic, and nonmelanocytic tumors. *Am J Surg Pathol* 2001;25:51-7.
310. King R, Googe PB, Weilbaecher KN, Mihm MC, Jr., Fisher DE. Microphthalmia transcription factor expression in cutaneous benign, malignant melanocytic, and nonmelanocytic tumors. *Am J Surg Pathol* 2001;25:51-7.
311. Gutman M, Singh RK, Radinsky R, Bar-Eli M. Intertumoral heterogeneity of receptor-tyrosine kinases expression in human melanoma cell lines with different metastatic capabilities. *Anticancer Res* 1994;14:1759-65.
312. Larue L, Dougherty N, Porter S, Mintz B. Spontaneous malignant transformation of melanocytes explanted from *Wf/Wf* mice with a Kit kinase-domain mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:7816-20.
313. Iwamoto S, Odland PB, Piepkorn M, Bothwell M. Evidence that the p75 neurotrophin receptor mediates perineural spread of desmoplastic melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1996;35:725-31.
314. Kucher C, Zhang PJ, Pasha T *et al.* Expression of Melan-A and Ki-67 in desmoplastic melanoma and desmoplastic nevi. *Am J Dermatopathol* 2004;26:452-7.
315. Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2006;126:154-60.
316. Attis MG, Burchette JL, Selim MA, Pham T, Soler AP. Differential expression of N-cadherin distinguishes a subset of metastasizing desmoplastic melanomas. *Hum Pathol* 2006;37:899-905.
317. Yildiz L, Kefeli M, Aydin O, Kandemir B. Fascin expression in melanocytic lesions of the skin. *Eur J Dermatol* 2009;19:445-50.
318. Winnepeninckx V, De Vos R, Stas M, van den Oord JJ. New phenotypical and ultrastructural findings in spindle cell (desmoplastic/neurotropic) melanoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003;11:319-25.
319. Riccioni L, Di Tommaso L, Collina G. Actin-rich desmoplastic malignant melanoma: report of three cases. *Am J Dermatopathol* 1999;21:537-41.
320. Hoang MP, Selim MA, Bentley RC, Burchette JL, Shea CR. CD34 expression in desmoplastic melanoma. *J Cutan Pathol* 2001;28:508-12.
321. Parente P, Coli A, Massi G, Mangoni A, Fabrizi MM, Bigotti G. Immunohistochemical expression of the glucose transporters Glut-1 and Glut-3 in human malignant melanomas and benign melanocytic lesions. *J Exp Clin Cancer Res* 2008;27:34.

## BIBLIOGRAFIA

322. French AD, Fiori JL, Camilli TC *et al.* PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci* 2009;6:93-101.
323. Leotlela PD, Wade MS, Duray PH *et al.* Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene* 2007;26:3846-56.
324. Trejo O, Reed JA, Prieto VG. Atypical cells in human cutaneous re-excision scars for melanoma express p75NGFR, C56/N-CAM and GAP-43: evidence of early Schwann cell differentiation. *J Cutan Pathol* 2002;29:397-406.
325. Botella-Estrada R, Sanmartin O, Sevilla A, Escudero A, Guillen C. Melanotic pigmentation in excision scars of melanocytic and non-melanocytic skin tumors. *J Cutan Pathol* 1999;26:137-44.
326. Requena C, Requena L, Kutzner H, Sanchez YE. Spitz nevus: a clinicopathological study of 349 cases. *Am J Dermatopathol* 2009;31:107-16.
327. Harris GR, Shea CR, Horenstein MG, Reed JA, Burchette JL, Jr., Prieto VG. Desmoplastic (sclerotic) nevus: an underrecognized entity that resembles dermatofibroma and desmoplastic melanoma. *Am J Surg Pathol* 1999;23:786-94.
328. Bhawan J, Cao SL. Amelanotic blue nevus: a variant of blue nevus. *Am J Dermatopathol* 1999;21:225-8.
329. Carr S, See J, Wilkinson B, Kossard S. Hypopigmented common blue nevus. *J Cutan Pathol* 1997;24:494-8.
330. Calonje E, Wadden C, Wilson-Jones E, Fletcher CD. Spindle-cell non-pleomorphic atypical fibroxanthoma: analysis of a series and delineation of a distinctive variant. *Histopathology* 1993;22:247-54.
331. Argenyi ZB. Spindle cell neoplasms of the skin: a comprehensive diagnostic approach. *Semin Dermatol* 1989;8:283-97.
332. Diaz-Cascajo C, Borghi S, Weyers W. Desmoplastic leiomyosarcoma of the skin. *Am J Dermatopathol* 2000;22:251-5.
333. Ries S, Barr R, LeBoit P, McCalmont T, Waldman J. Cutaneous sarcomatoid B-cell lymphoma. *Am J Dermatopathol* 2007;29:96-8.
334. Egbert B, Kempson R, Sagebiel R. Desmoplastic malignant melanoma. A clinicohistopathologic study of 25 cases. *Cancer* 1988;62:2033-41.
335. Hawkins WG, Busam KJ, Ben Porat L *et al.* Desmoplastic melanoma: a pathologically and clinically distinct form of cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol* 2005;12:207-13.
336. Busam KJ, Mujumdar U, Hummer AJ *et al.* Cutaneous desmoplastic melanoma: reappraisal of morphologic heterogeneity and prognostic factors. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1518-25.
337. Scolyer RA, Thompson JF. Desmoplastic melanoma: a heterogeneous entity in which subclassification as "pure" or "mixed" may have important prognostic significance. *Ann Surg Oncol* 2005;12:197-9.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

338. Patel SG, Coit DG, Shaha AR *et al.* Sentinel lymph node biopsy for cutaneous head and neck melanomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:285-91.
339. Chao C, Wong SL, Edwards MJ *et al.* Sentinel lymph node biopsy for head and neck melanomas. *Ann Surg Oncol* 2003;10:21-6.
340. Pawlik TM, Ross MI, Prieto VG *et al.* Assessment of the role of sentinel lymph node biopsy for primary cutaneous desmoplastic melanoma. *Cancer* 2006;106:900-6.
341. Pestana D, Velosa SF. *Introdução à probabilidade e à estatística*. Pestana,D., 2008.
342. Chambers, J. The r project for statistical computing. 1984. Free Software Foundation's GNU General Public License.
343. Mosteller F, Rourke REK. *Sturdy statistics: nonparametrics and order statistics*. Reading,MA: Addison-Wesley, 1973.
344. Sheskin DJ. *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures*. Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC, 2002.
345. Siegel S, Castellan NJ. *Nonparametric statistics for the behavioural sciences*. New York: McGraw-Hill, 1988.
346. Gaynor R, Herschman HR, Irie R, Jones P, Morton D, Cochran A. S100 protein: a marker for human malignant melanomas? *Lancet* 1981;1:869-71.
347. Wharton JM, Carlson JA, Mihm MC, Jr. Desmoplastic malignant melanoma: diagnosis of early clinical lesions. *Hum Pathol* 1999;30:537-42.
348. Frankel TL, Lowe L, Sabel MS. Desmoplastic melanoma: a horse of a different color. *Current Medical Literature Dermatology* 2006;11:85-94.
349. Busam KJ. Cutaneous desmoplastic melanoma. *Adv Anat Pathol* 2005;12:92-102.
350. Arora A, Lowe L, Su L *et al.* Wide excision without radiation for desmoplastic melanoma. *Cancer* 2005;104:1462-7.
351. Jain S, Allen PW. Desmoplastic malignant melanoma and its variants. A study of 45 cases. *Am J Surg Pathol* 1989;13:358-73.
352. Vongtama R, Safa A, Gallardo D, Calcaterra T, Juillard G. Efficacy of radiation therapy in the local control of desmoplastic malignant melanoma. *Head Neck* 2003;25:423-8.
353. Payne WG, Kearney R, Wells K *et al.* Desmoplastic melanoma. *Am Surg* 2001;67:1004-6.
354. Anstey A, McKee P, Jones EW. Desmoplastic malignant melanoma: a clinicopathological study of 25 cases. *Br J Dermatol* 1993;129:359-71.
355. Weinzweig N, Tuthill RJ, Yetman RJ. Desmoplastic malignant melanoma: a clinicohistopathologic review. *Plast Reconstr Surg* 1995;95:548-55.

## BIBLIOGRAFIA

356. Lens MB, Newton-Bishop JA, Boon AP. Desmoplastic malignant melanoma: a systematic review. *Br J Dermatol* 2005;152:673-8.
357. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC, Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun* 2009;9:3.
358. Blessing K, McLaren KM. Histological regression in primary cutaneous melanoma: recognition, prevalence and significance. *Histopathology* 1992;20:315-22.
359. Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol* 2003;139:1620-4.
360. Gruber SB, Barnhill RL, Stenn KS, Roush GC. Nevomelanocytic proliferations in association with cutaneous malignant melanoma: a multivariate analysis. *J Am Acad Dermatol* 1989;21:773-80.
361. Banerjee SS, Eyden B. Divergent differentiation in malignant melanomas: a review. *Histopathology* 2008;52:119-29.
362. Banerjee SS, Coyne JD, Menasce LP, Lobo CJ, Hirsch PJ. Diagnostic lessons of mucosal melanoma with osteocartilaginous differentiation. *Histopathology* 1998;33:255-60.
363. Cachia AR, Kedziora AM. Subungual malignant melanoma with cartilaginous differentiation. *Am J Dermatopathol* 1999;21:165-9.
364. Giele H, Hollowood K, Gibbons CL, Wilson DJ, Athanasou NA. Subungual melanoma with osteocartilaginous differentiation. *Skeletal Radiol* 2003;32:724-7.
365. Das Gupta TK, Chaudhuri PK. *Tumors of the soft tissues*. Stamford, Connecticut: Appleton & Lange, 1998.
366. Enzinger FM, Weiss SW. *Soft tissue tumors*. St. Louis: Mosby-Year Book, 1995.
367. Wick MR, Swanson PE, Scheithauer BW, Manivel JC. Malignant peripheral nerve sheath tumor. An immunohistochemical study of 62 cases. *Am J Clin Pathol* 1987;87:425-33.
368. Skelton HG, Maceira J, Smith KJ, McCarthy WF, Lupton GP, Graham JH. HMB45 negative spindle cell malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 1997;19:580-4.
369. Valensi QJ. Desmoplastic malignant melanoma: A light and electron microscopic study of two cases. *Cancer* 1979;43:1148-55.
370. Beltraminelli H, Shabrawi-Caelen LE, Kerl H, Cerroni L. Melan-a-positive "pseudomelanocytic nests": a pitfall in the histopathologic and immunohistochemical diagnosis of pigmented lesions on sun-damaged skin. *Am J Dermatopathol* 2009;31:305-8.
371. Orosz Z. Melan-A/Mart-1 expression in various melanocytic lesions and in non-melanocytic soft tissue tumours. *Histopathology* 1999;34:517-25.
372. Wu JM, Alvarez H, Garcia P *et al*. Melanoma Hyperpigmentation Is Strongly Associated With KIT Alterations. *Am J Dermatopathol* 2009.

## MELANOMA MALIGNO DESMOPLÁSICO

373. Isabel ZY, Fitzpatrick JE. Expression of c-kit (CD117) in Spitz nevus and malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 2006;33:33-7.
374. Radfar A, Stefanato CM, Ghosn S, Bhawan J. NGFR-positive desmoplastic melanomas with focal or absent S-100 staining: Further evidence supporting the use of both NGFR and S-100 as a primary immunohistochemical panel for the diagnosis of desmoplastic melanomas. *Am J Dermatopathol* 2006;28:162-7.
375. Tapia C, Kutzner H, Mentzel T, Savic S, Baumhoer D, Glatz K. Two mitosis-specific antibodies, MPM-2 and phospho-histone H3 (Ser28), allow rapid and precise determination of mitotic activity. *Am J Surg Pathol* 2006;30:83-9.
376. Lang J, Boxer M, MacKie R. Absence of exon 15 BRAF germline mutations in familial melanoma. *Hum Mutat* 2003;21:327-30.
377. Edmunds SC, Cree IA, Di Nicolantonio F, Hungerford JL, Hurren JS, Kelsell DP. Absence of BRAF gene mutations in uveal melanomas in contrast to cutaneous melanomas. *Br J Cancer* 2003;88:1403-5.
378. Schrama D, Keller G, Houben R *et al.* BRAFV600E mutations in malignant melanoma are associated with increased expressions of BAALC. *J Carcinog* 2008;7:1.
379. High WA, Robinson WA. Genetic mutations involved in melanoma: a summary of our current understanding. *Adv Dermatol* 2007;23:61-79.
380. Seemayer TA, Lagace R, Schurch W, Tremblay G. Myofibroblasts in the stroma of invasive and metastatic carcinoma: a possible host response to neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1979;3:525-33.
381. Lane N. Pseudosarcoma (polypoid sarcoma-like masses) associated with squamous-cell carcinoma of the mouth, fauces, and larynx; report of ten cases. *Cancer* 1957;10:19-41.
382. Battifora H. Spindle cell carcinoma: ultrastructural evidence of squamous origin and collagen production by the tumor cells. *Cancer* 1976;37:2275-82.
383. Harris M. Differential diagnosis of spindle cell tumours by electron microscopy--personal experience and a review. *Histopathology* 1981;5:81-105.
384. Harris M. Spindle cell squamous carcinoma: ultrastructural observations. *Histopathology* 1982;6:197-210.
385. Kannerstein M, Churg J. Mesothelioma in man and experimental animals. *Environ Health Perspect* 1980;34:31-6.
386. Cantin R, Al Jabi M, McCaughey WT. Desmoplastic diffuse mesothelioma. *Am J Surg Pathol* 1982;6:215-22.
387. Henson DE. Heterogeneity in tumors. *Arch Pathol Lab Med* 1982;106:597-8.
388. Labrecque PG, Hu CH, Winkelmann RK. On the nature of desmoplastic melanoma. *Cancer* 1976;38:1205-13.

## BIBLIOGRAFIA

389. From L, Hanna W, Kahn HJ, Gruss J, Marks A, Bauml R. Origin of the desmoplasia in desmoplastic malignant melanoma. *Hum Pathol* 1983;14:1072-80.
390. Kacerovska D, Michal M, Kutzner H, Rychnovsky J, Kazakov DV. Metastatic desmoplastic malignant melanoma associated with low-grade myofibroblastic sarcoma. *Am J Dermatopathol* 2009;31:490-4.
391. Longacre TA, Egbert BM, Rouse RV. Desmoplastic and spindle-cell malignant melanoma. An immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1489-500.
392. Moinfar F, Beham A, Friedrich G *et al*. Macro-environment of breast carcinoma: frequent genetic alterations in the normal appearing skins of patients with breast cancer. *Mod Pathol* 2008;21:639-46.
393. Hawsawi NM, Ghebeh H, Hendrayani SF *et al*. Breast carcinoma-associated fibroblasts and their counterparts display neoplastic-specific changes. *Cancer Res* 2008;68:2717-25.
394. Ruiter D, Bogenrieder T, Elder D, Herlyn M. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol* 2002;3:35-43.
395. Goncharuk VN, Ross JS, Carlson JA. Actin-binding protein fascin expression in skin neoplasia. *J Cutan Pathol* 2002;29:430-8.
396. Gilbert N. *Biometrical interpretation. Making sense of statistics in biology*. New York: Oxford University Press, 1989.
397. Motulsky H. *Intuitive Biostatistics*. USA: Oxford University Press, 1995.
398. van Belle G. *Statistical Rules of Thumb*. Hoboken: Wiley, 2008.
399. Davey SG, Egger M. Statistical problems. *BMJ* 1994;308:1025-7.
400. Davey SG, Egger M, Phillips AN. Meta-analysis. Beyond the grand mean? *BMJ* 1997;315:1610-4.
401. Davey SG, Egger M. Meta-analysis. Unresolved issues and future developments. *BMJ* 1998;316:221-5.
402. Egger M, Davey SG, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997;315:629-34.
403. Egger M, Davey-Smith G. Meta-analysis: potentials and promise. *BMJ* 1997;315:1371-4.
404. Hartung J, Knapp G, Sinha BK. *Statistical Meta-Analysis with Applications*. Hoboken,NJ: John Wiley & Sons,Inc., 2008.
405. Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, Rothstein HR. *Introduction to Meta-Analysis*. Chichester, UK: Wiley, 2009.
406. Kulinskaya S, Morgenthaler S, Staudte RG. *Meta Analysis: A Guide to Calibrating and Combining Statistical Evidence*. Chichester, UK: Wiley, 2008.



## 9.1. FIGURAS

- Figura 1.** Localizações anatómicas distintas de MMD: A e B – região frontal, C – lábio inferior, D – subungueal..... 69
- Figura 2.** Lesões amelanóticas de MMD simulando: A – verrugas vulgares, B – queratoses actínicas, C – tumor indiferenciado, D – basalioma..... 70
- Figura 3.** Lesões pigmentadas de MMD simulando: A e C – carcinoma espinocelular, B – verruga seborreica, D – melanoma maligno ..... 70
- Figura 4.** Melanoma desmoplásico em H&E. A: Pequena ampliação de uma lesão que afecta difusamente toda a derme e atinge o tecido celular subcutâneo. B: A epiderme mostra certo grau de hiperplasia e não se observa componente melanocítico juncional, nem intraepidérmico. C: A lesão é constituída por feixes de células fusiformes. D: Entre as células neoplásicas observa-se marcada desmoplasia do estroma..... 75
- Figura 5.** Diferentes padrões de compromisso intraepidérmico em MMD, apesar de todos eles se caracterizarem pelo predomínio de melanócitos isolados sobre tecas de melanócitos. A e B: Padrão de lântigo maligno. C: Padrão de melanoma maligno de extensão superficial *in situ*. D: Padrão de melanoma maligno acrolentiginoso *in situ*..... 76
- Figura 6.** Diferentes padrões de infiltração neural em MMD. A: Perineural. B: Intraneural. C: Com infiltrado linfocitário denso perineural. D: Perineural em “casca de cebola” ..... 76
- Figura 7.** Diferentes tipos citológicos observados no MMD. A: Em ninhos de células redondas que dão à lesão uma aparência nevóide. B: Núcleos ligeiramente hiper cromáticos. C: Células fusiformes de núcleo pequeno e com escassa atipia. D: Núcleos maiores e pleomórficos..... 77

**Figura 8.** As figuras de mitose podem ser observadas nos melanócitos neoplásicos de MMD, tanto no componente intraepitelial (A), como no componente intradérmico (B, C e D)..... 77

**Figura 9.** MMD com abundantes agregados linfóides. A. Pequena ampliação mostrando uma lesão que infiltra difusamente toda a derme e atinge o tecido celular subcutâneo. Os agregados linfóides são mais abundantes nas áreas profundas da neoplasia. B: Também se observam agregados linfóides salpicando o componente dérmico do tumor. C: Nas áreas profundas do tumor é mais evidente a desmoplasia da lesão. D: Detalhe dos agregados linfóides na união dermo-hipodérmica..... 78

**Figura 10.** Imunomarcção para proteína S-100 de um MMD. A: Pequena ampliação mostrando células isoladas com expressão de proteína S-100 em toda a espessura da neoplasia. B: Em maior aumento, observa-se o escasso componente juncional S-100 positivo e a positividade de muitas das células do componente dérmico. C: A maioria das células fusiformes, imersas no estroma desmoplásico, expressa proteína S-100. D: A imunomarcção da proteína S-100 pode ser observada tanto no núcleo, como no citoplasma das células neoplásicas..... 87

**Figura 11.** Imunomarcção para Melan-A de um MMD. A: Pequena ampliação mostrando positividade apenas no componente intraepidérmico e negatividade na quase totalidade do componente dérmico. B: Em maior ampliação observa-se que só algumas das células neoplásicas isoladas, localizadas na derme superficial, expressam Melan-A. C: Intensa positividade para o Melan-A do componente intraepidérmico da neoplasia. D: A expressão de Melan A no componente intraepidérmico observa-se tanto em células neoplásicas dispostas ao longo da união dermo-epidérmica como em células isoladas dispersas nas camadas altas da epiderme..... 87

**Figura 12.** Imunomarcção para MITF de um MMD. A: Pequena ampliação mostrando que as células neoplásicas fusiformes do componente dérmico são positivas na metade esquerda do tumor. A maioria das células neoplásicas localizadas na metade direita do tumor incluindo as que salpicam os numerosos agregados linfóides, não expressam MITF. B: A positividade das células neoplásicas para MITF observa-se em toda a espessura do componente intradérmico. C: Nestas áreas predominam os feixes de células fusiformes MITF positivas, com escasso estroma desmoplásico a separá-los. D: Em maior ampliação observa-se que a positividade para MITF se localiza no núcleo das células neoplásicas..... 88

**Figura 13.** Imunomarcção para P75 de um MMD. A: Pequena ampliação mostrando intensa imuno-expressão de P75 nos componentes intraepidérmico e dérmico da neoplasia. B: O componente intraepidérmico da neoplasia, que expressa P75, localiza-se preferencialmente ao longo da camada basal da epiderme. C: Intensa positividade para P75 nas células neoplásicas do componente intradérmico. D: Em maior ampliação observa-se o pleomorfismo nuclear das células neoplásicas, assim como a sua morfologia fusiforme ou ovalada dependendo do plano de corte..... 88

**Figura 14.** Imunomarcação para C-KIT de um MMD. A: Pequena ampliação mostrando que a neoplasia é negativa para C-KIT em toda a sua espessura. B: Em maior aumento adivinha-se que algumas células isoladas, salpicadas pela neoplasia, expressam C-KIT. C: Estas células C-KIT positivas são mais redondas e com citoplasma mais vasto que os melanócitos neoplásicos, que exibem uma morfologia fusiforme com citoplasma escasso. D: Em maior ampliação comprova-se que as células C-KIT positivas são mastócitos dispersos na lesão tumoral..... 89

**Figura 15.** Imunomarcação para MPM-2 de um MMD. A: Em pequena ampliação observa-se escassa expressão deste marcador em toda a espessura da neoplasia. B: A expressão máxima deste marcador é observada nas células dos agregados linfóides, enquanto que a grande maioria dos melanócitos neoplásicos são negativos. C: Em maior aumento, comprova-se que a maioria dos melanócitos neoplásicos não expressam MPM-2, o que está de acordo com o baixo índice mitótico desta neoplasia. D: Só alguns núcleos isolados das células neoplásicas expressam MPM-2..... 91

**Figura 16.** Imunomarcação para P21 num MMD. A: Pequena ampliação em que se observa escassa imunomarcação para este marcador na maioria das células neoplásicas. B: Em maior aumento, comprova-se que a expressão deste marcador é mais intensa no componente intraepidérmico e dérmico superficial da neoplasia. C: Algumas células isoladas dos feixes de células fusiformes expressam P21. D: Em maior aumento, comprova-se que a expressão de P21 é mais acentuada no núcleo de algumas células neoplásicas, que aparece pleomórfico e hiper Cromático..... 92

**Figura 17.** Imunomarcação para P27 num MMD. A: Pequena ampliação em que se observa intensa imuno-expressão para P27 nas células neoplásicas. B: A positividade para o P27 observa-se tanto no componente intraepidérmico como no dérmico do tumor. C: Detalhe da intensa reactividade para P27 nas células fusiformes dos feixes intradérmicos da neoplasia. D: Detalhe da maior intensidade de imunomarcação para P27 nas células mais pleomórficas..... 92

**Figura 18.** Imunomarcação para o gene de retinoblastoma num MMD. A positividade para este marcador é observada tanto nos feixes de células fusiformes (A e C) como nos ninhos de células mais arredondadas (B e D)..... 93

**Figura 19.** Imunomarcação para N-caderina num MMD. A: Pequena ampliação em que se observa que a positividade para este marcador está circunscrita ao componente dérmico da neoplasia. B: A maior aumento, observa-se a expressão de N-caderina nas células de todo a espessura do componente dérmico da neoplasia. C: As células que expressam N-caderina possuem uma morfologia fusiforme. D: Detalhe da expressividade citoplasmática para N-caderina..... 95

## 9.2. QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Diagnóstico diferencial dos tumores negros cutâneos.....	13
<b>Quadro 2.</b> Classificação histológica do melanoma maligno.....	19
<b>Quadro 3.</b> Características de alguns marcadores de diferenciação melanocítica.....	22
<b>Quadro 4.</b> Características de marcadores de progressão e sinalização tumoral.....	27
<b>Quadro 5.</b> Ciclinas, CDK e CDKi.....	29
<b>Quadro 6.</b> Vias MAPK e PI3K.....	32
<b>Quadro 7.</b> Características de marcadores de células do estroma.....	35
<b>Quadro 8.</b> Classificação TNM de melanomas malignos cutâneos.....	39
<b>Quadro 9.</b> Grupos de estadiamento do melanoma maligno cutâneo.....	40
<b>Quadro 10.</b> Percentagem de sobrevida livre de doença aos 10 anos.....	42
<b>Quadro 11.</b> Marcadores imuno-histoquímicos com interesse prognóstico.....	43
<b>Quadro 12.</b> Regulação de marcadores de proliferação tumoral em MM.....	52
<b>Quadro 13.</b> Características dos anticorpos usados no estudo imuno-histoquímico.....	66
<b>Quadro 14.</b> Dados clínicos dos 113 doentes com Melanoma desmoplásico.....	71
<b>Quadro 15.</b> Consultas de seguimento dos doentes com MMD.....	74
<b>Quadro 16.</b> Tempo de seguimento dos doentes com MMD.....	74
<b>Quadro 17.</b> Resultados histológicos dos 113 doentes com MMD.....	79
<b>Quadro 18.</b> Correlação entre o envolvimento neural e o nível de Breslow no MMD.....	82
<b>Quadro 19.</b> Características clínico-patológicas dos doentes seleccionados para estudo imuno-histoquímico.....	84
<b>Quadro 20.</b> Marcadores de diferenciação melanocítica.....	85
<b>Quadro 21.</b> Totais de marcação para cada marcador melanocítico isolado.....	86
<b>Quadro 22.</b> Marcadores de progressão e sinalização tumoral.....	90
<b>Quadro 23.</b> Totais de marcadores isolados de progressão e sinalização tumoral.....	90

## ANEXOS

<b>Quadro 24.</b> Marcadores de células do estroma.....	94
<b>Quadro 25.</b> Totais parciais de marcadores de células do estroma.....	94
<b>Quadro 26.</b> Soma de ranks dos marcadores de diferenciação melanocítica.....	96
<b>Quadro 27.</b> Características da apresentação clínica de MMD.....	101
<b>Quadro 28.</b> Características histológicas do MMD.....	104
<b>Quadro 29.</b> Positividade dos marcadores imuno-histoquímicos de diferenciação melanocítica no MMD.....	109

### 9.3. GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Idade dos doentes com MMD.....	72
<b>Gráfico 2.</b> Sexo dos doentes com MMD.....	72
<b>Gráfico 3.</b> Localização anatómica do MMD.....	72
<b>Gráfico 4.</b> Diagnóstico clínico em doentes com MMD.....	73
<b>Gráfico 5.</b> MMD: Breslow (mm).....	80
<b>Gráfico 6.</b> MMD: níveis de Clark.....	81
<b>Gráfico 7:</b> MMD: envolvimento neural.....	81
<b>Gráfico 8:</b> Presença de agregados linfóides em MMD.....	82

### 9.4. TABELA

<b>Tabela da série de MMD estudados.....</b>	<b>157</b>
--	------------



### Tabela da série de MMD estudados

Nas páginas seguintes anexamos Tabela contendo as variáveis clínicas e histológicas estudadas nos 113 casos:

- Sexo
  - Idade
  - Localização anatómica
  - Diagnóstico Clínico
  - Variante de MMD em relação com o grau de desmoplasia
  - Presença de componente melanocítico intraepidérmico
  - Invasão folicular
  - Elastose
  - Ulceração
  - Espessura do MM em mm
  - Nível de Clark
  - Envolvimento neural
  - Invasão vascular
  - Morfologia dos melanócitos
  - Morfologia dos núcleos dos melanócitos
  - Número de mitoses/mm<sup>2</sup>
  - Quantidade histológica de pigmento melânico
  - Agregados linfóides
  - Localização do infiltrado inflamatório na derme
  - Regressão
  - Espessura da epiderme
  - Faixa de Grenz
  - Presença de nevo associado
  - Quantidade de mucina no estroma
  - Ocorrência de metaplasia óssea ou cartilágnea
  - Meses de seguimento do doente
  - Situação actual do doente – vivo ou morto
  - Recidiva local
  - Invasão ganglionar
  - Metástases sistémicas.
- 
- Em **BOLD** todos os 15 casos estudados por imuno-histoquímica:
    - o **76, 78, 83, 84, 87, 88, 92, 94, 95, 98, 99, 102, 103, 104, 110.**
  
  - Legenda na página 158.

**Legenda da tabela dos 113 casos de MMD**

0, ausente  
 < 1 mitose/mm<sup>2</sup> (taxa mitótica baixa)  
 1 - 4 mitoses/mm<sup>2</sup> (taxa mitótica moderada)  
 > 4 mitoses/mm<sup>2</sup> (taxa mitótica alta)  
 A, epiderme atrófica  
 ABC, 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> ou 3<sup>a</sup> biópsia ou excisão  
 AEp, ausência de epiderme  
 At, núcleo atípico  
 BSE, bolha subepidérmica  
 C, MMD combinado ou misto  
 CG, células multinucleadas  
 Dest, destruição dos folículos pilosos  
 DFSP, dermatofibrosarcoma *protuberans*  
 E, melanócito epitelióide  
 E1, elastose escassa  
 E2, elastose moderada  
 E3, elastose abundante  
 EN, envolvimento endoneural  
 F, melanócito fusiforme  
 FXA, fibroxantoma atípico  
 H, núcleo hipercromático  
 Ht, epiderme hipertrófica  
 IF, invasão folicular  
 IV, invasão vascular  
 L, presença de agregados linfóides  
 LM, lêntigo maligno  
 M, morto  
 M1, mucina escassa  
 M2, mucina abundante  
 MC, melanócito multinucleado  
 MM, melanoma maligno  
 MMcS, MM de crescimento superficial  
 MMD, melanoma desmoplásico  
 Mono, núcleos monomorfos  
 N, epiderme com espessura normal para a área anatômica  
 NA, nevo associado  
 ND, não disponível  
 Ov, melanócito ovóide  
 P, MMD puro  
 Pag, disseminação melanocítica intraepidérmica pagetóide  
 Pleo, núcleos pleomórficos  
 P1, pigmento melânico escasso  
 P2, pigmento melânico abundante  
 PN, envolvimento perineural  
 R, melanócito redondo  
 Reg, regressão  
 S, atipia melanocítica intra-epidérmica não classificável  
 SP, derme superficial e profunda  
 SUP, derme superficial  
 U, ulceração  
 Ves, núcleo vesiculoso  
 V, vivo  
 ZG, faixa de Grenz

CASO Nº	LÂMINA Nº	SEXO	IDADE	LOCALIZAÇÃO	DIAGNÓSTICO CLÍNICO	DESMOPLASIA	MM in situ	INVASÃO FOLICULAR	ELASTOSE	ULCERAÇÃO	BRESLOW	CLARK	ENVOLVIMENTO NEURAL	INVASÃO VASCULAR	MELANOCITOS	NÚCLEOS	MITOSES	PIGMENTO	AGREGADOS LINFÓIDES	INFILTRADO INFLAMATORIO	REGRESSÃO	ESPESSURA EPIDERMIE	FAIXA DE GRENZ	NEVO ASSOCIADO	MUCINA	METAPLASIA ÓSSEA OU CARTILAGINEA	MESES DE SEGUIMENTO	VIVO/MORTO	RECIDIVA LOCAL	INVASÃO GANGLIONAR	METASTASES SISTÊMICAS
1	88/064440	M	54	NARIZ	QUELOIDE	C	CG+ Tecas	IF	E2	0	3.0	IV	0	0	PleoF+E+MC	H	0	0	L	SP	0	A	0	0	0	0	84,08	V	ND	ND	ND
2	88/701173	F	78	FRONTAL	QUERATOSE ACTÍNICA	C	LM	0	E1	0	4.0	IV/V	EN	0	H+MC	H=At	0	P1	0	SUP	0	A	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
3	89/113389 II	F	80	MALAR	LM	C	Pag	IF	E3	0	1.0	IV	0	0	F	E	0	P1	0	SUP	0	N	ZG	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
4	90/050152	F	58	CALCANHAR	DFSP	C	MM Acral	0	0	0	6.0	V	0	0	F	Mono	0	0	0	0	0	Ht	0	0	0	0	60,07	M	ND	ND	ND
5	91/024992	M	71	COURO CABELUDO	NEVO	C	0	0	E3	U	3.0	V	EN+PN	0	R+F	Ves	2	0	0	0	0	A	ZG	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
6	91/031858	F	72	MALAR	QUISTO	C	LM	IF	E2	0	2.5	IV	0	0	F	H	1	0	0	0	0	A	ZG	0	0	0	17,83	V	ND	ND	ND
7	91/065217	M	77	DORSO	MM	C	Pag+MMcS	0	0	0	5.3	IV/V	PN	0	R	Pleo+Ves	2	P2	0	SUP	0	A	ZG	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
8	91/081902	F	64	MALAR	NEVO	P	MMcS	0	E3	0	3.5	IV/V	PN	0	F	Ves	0	0	L	SUP	0	A	ZG	0	0	0	4,44	V	ND	ND	ND
9	91/128221	F	85	MALAR	VERRUGA SEBORREICA	C	LM	Dest	E3	0	1.5	IV	0	0	Ov	Ves	0	P2	L	SUP	0	A	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
10	92/068720	M	72	MALAR	QUISTO	C	0	0	E2	0	9.0	V	0	0	F	Ves	6	0	L	0	0	N	ZG	0	0	0	132,14	M	0	0	2003
11	92/092613	M	81	MALAR	BASALIOMA	C	Pag	IF	E2	0	2.0	IV	0	0	F	Ves	0	P1	0	0	0	Ht	0	0	0	0	7,07	ND	ND	ND	ND
12	92/098543+92/K5522	F	78	FRONTAL	BASALIOMA	C	LM	IF	E2	U	6.5	V	EN+PN	0	F	Pleo	3	P1	L	SUP	0	A	0	NA	M2	0	ND	V	ND	ND	ND
13	92/107689	F	60	PALPEBRA	BASALIOMA	C	LM	0	E3	U	1.2	IV	0	0	F	Ves	0	0	0	0	0	A	ZG	0	M1	0	177,2	V	ND	ND	ND
14	92/112666	F	72	TEMPORAL	BASALIOMA	C	LM	0	E2	0	7.0	IV	0	0	F	Ves	0	P1	0	0	0	A	ZG	0	0	0	164,18	M	ND	ND	ND
15	93/043791	F	83	MENTO	CARCINOMA ESPINOCELULAR	C	0	0	E1	0	2.0	IV	0	0	F	Ves	0	0	0	SP	0	N	ZG	0	0	0	7,99	M	ND	ND	ND
16	93/058668	M	70	OMBRO	NEVO	C	Pag+ Tecas	0	E1	0	4.0	V	0	0	F	Ves	0	P1	0	SUP	0	N	ZG	0	0	0	166,41	V	ND	ND	ND
17	93/151607	F	78	FRONTAL	VERRUGA SEBORREICA	P	Pag	IF	E3	0	6.0	V	0	0	F	Ves	0	0	L	0	0	N	0	0	0	0	14,47	M	ND	ND	ND
18	93/152381	M	63	PESCOÇO	BASALIOMA	C	0	0	E2	U	7.0	V	EN	0	F	Ves	0	0	L	SP	0	N	ZG	0	M2	0	150,26	V	ND	0	0
19	93/157331	F	62	MALAR	TUMOR VERRUCOSO	C	LM	IF	E3	0	1.9	IV	PN	0	Pleo+F	H	0	0	0	SP	0	N	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
20	93/113841	F	92	MALAR	BASALIOMA	P	LM	IF	E2	0	5.0	V	0	0	E+F	H	2	0	0	SUP	0	N	ZG	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
21	94/227002	M	43	DORSO	BASALIOMA	C	Pag+ Tecas	IF	0	0	4.0	IV	EN+PN	0	F	Ves	0	P1	0	SUP	0	N	0	0	M1	0	ND	V	ND	ND	ND
22	94/266282	M	74	TEMPORAL	CARCINOMA ESPINOCELULAR	P	LM	Dest	E2	U	3.7	IV	0	0	F	Ves	0	0	L	SUP	0	A	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
23	94/294467	M	70	MALAR	BASALIOMA	C	LM	IF	E2	0	2.5	IV	0	0	Pleo+F+MC	H	0	P1	L	SP	0	A	0	0	0	0	156,18	V	ND	ND	ND
24	94/03672 Mu	F	79	PALPEBRA	LM	C	LM	0	E1	0	1.4	IV	0	0	Pleo+F	H	0	0	L	0	0	N	0	0	M2	0	ND	V	ND	ND	ND
25	94/02111 Mu	F	50	MALAR	MMD	C	LM	IF	E1	0	2.5	IV	0	0	F	H	0	0	0	0	0	N	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
26	93/10574 Mu	F	66	MALAR	LENTIGO SIMPLES	C	LM	0	E1	0	1.4	IV	0	0	Pleo+F	H	0	0	0	0	0	A	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
27	93/06661 Mu	F	78	ND	ND	C	LM	0	E3	0	6.0	IV	0	0	F	H	0	0	0	0	0	A	0	0	M2	0	ND	V	ND	ND	ND
28	92/07673 Mu	M	79	PRE-ESTERNAL	MM	C	LM	0	E1	0	5.5	IV	0	0	F	H	0	0	0	SP	0	A	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
29	94/319851	F	73	DORSO	BASALIOMA	C	Tecas	IF	E2	0	1.4	IV	0	0	F	H	0	0	0	SP	0	N	ZG	NA	0	0	60,07	V	ND	ND	ND
30	94/367968	F	72	NARIZ	QUERATOSE ACTÍNICA	C	LM	IF	E2	0	3.0	IV/V	EN	0	E+F	Ves	0	P1	0	SUP	0	N	ZG	NA	M2	0	ND	V	ND	ND	ND

CASO Nº	LÂMINA Nº	SEXO	IDADE	LOCALIZAÇÃO	DIAGNÓSTICO CLÍNICO	DESMOPLASIA	MM in situ	INVASÃO FOLICULAR	ELASTOSE	ULCERAÇÃO	BRESLOW	CLARK	ENVOLVIMENTO NEURAL	INVASÃO VASCULAR	MELANOCITOS	NÚCLEOS	MITOSES	PIGMENTO	AGREGADOS LINFÓIDES	INFILTRADO INFLAMATORIO	REGRESSÃO	ESPESSURA EPIDERMICA	FAIXA DE GRENZ	NEVO ASSOCIADO	MUCINA	METAPLASIA ÓSSEA OU CARTILAGINEA	MESES DE SEGUIMENTO	VIVO/MORTO	RECIDIVA LOCAL	INVASÃO GANGLIONAR	METASTASES SISTÊMICAS	
31	94/368043	M	58	MALAR	QUISTO	C	LM+Tecas	0	E2	0	2.5	IV	0	0	F	Ves	0	0	0	SUP	0	N	0	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
32	94/369496	F	80	MALAR	LM	P	Pag	0	E2	U	3.0	IV/V	0	0	Pleo+F	Ves+H	0	0	0	SP	0	N	0	0	M1	0	ND	V	ND	ND	ND	
33	94/350396	M	75	COURO CABELUDO	BASALIOMA	C	0	Dest	E2	0	11.0	V	0	0	Pleo+F+E	Ves+H	0	0	0	0	0	A	0	0	0	0	37,4	V	ND	ND	ND	
34	95/745+1570 Wu	F	69	MALAR	LM	P	LM	0	E1	0	1.7	IV	0	0	Pleo+F	H	2	0	0	SUP	0	N	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	
35AB	94/316012 + 95/442925	F	81	LÁBIO	LM	P	Pag	IF	E2	0	6.0	V	0	0	F	Ves	0	0	L	SUP	0	N	0	0	M1	0	36,05	M	ND	ND	ND	
36AB	93/031592 + 95/487470	F	84	MALAR	LM	P	LM	0	E3	0	5.0	IV/V	0	0	Pleo+F	Ves+H	0	0	0	SUP	0	N	ZG	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND	
37ABC	95/601454 + 95/617230 + 96/K713	F	70	3º DEDO MÃO	TUMOR SUBUNGUEAL	C	MM Acral	0	0	0	4.0	IV	EN+PN	0	E+F	Ves	2	0	0	SUP	0	N	BSE	0	0	0	72,11	V	0	1995/2001*	0	
38	96/690356	F	75	FRONTAL	CICATRIZ	P	Pag	0	E2	0	2.5	IV	0	0	F	H	0	0	0	0	0	N	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND	
39	95/514366	F	76	MALAR	NEVO	C	LM+Tecas	0	E3	0	4.0	IV	0	0	F	Ves	0	0	0	0	0	N	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND	
40	96/751938	F	67	MALAR	NEVO	C	Pag	IF	E3	0	1.6	IV	0	0	F	H	0	P1	0	0	0	N	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND	
41	96/761055	F	65	PALPEBRA	BASALIOMA	P	0	0	E1	0	2.2	IV	0	0	F	Ves	0	0	L	0	0	N	ZG	0	0	0	129,28	V	0	0	0	
42	97/927374	M	83	FACE	BASALIOMA	C	Tecas	IF	E3	0	2.2	IV	0	0	Pleo+F	H	2	0	0	SP	0	N	ZG	0	M1	0	1,12	V	ND	ND	ND	
43	97/932413	M	82	FRONTAL	SARCOMA	P	LM	IF	E1	0	1.8	III	PN	0	Pleo+F	Ves	1	0	L	SP	0	N	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND	
44	98/130302	M	70	MALAR	NEVO	C	LM	0	E2	0	4.0	IV	0	0	Pleo+MC	H	0	0	L	0	0	N	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND	
45AB	96/786767 + 98/112591	M	64	FACE	MMD	P	LM	Dest	E3	U	3.0	IV	EN+PN	0	Pleo+F	Ves	3	0	L	SP	0	A	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND	
46ABC	96/841936 + 98/102382 (BAD) +98/37 Fr	M	58	COURO CABELUDO	QUERATOSE ACTÍNICA	P	LM+Tecas	Dest	E2	0	4.0	V	PN	0	E+F	Ves	1	0	0	SUP	Reg	A	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND	
47	98/283107	F	79	FRONTAL	TUMOR	P	LM	0	E1	0	2.4	IV/V	0	0	F	Ves	0	0	0	0	0	Ht	0	0	0	0	28,95	V	0	0	0	
48	98/283249	M	75	MALAR	MM	P	0	Dest	E2	0	6.0	V	0	0	R+F	Ves+H	0	0	0	SUP	0	N	ZG	0	0	0	104,7	V	2007	0	0	
49	98/155659	M	79	MALAR	BASALIOMA	P	LM	Dest	E1	0	5.0	V	0	0	R	Ves	1	0	0	0	0	N	ZG	0	0	0	72,11	ND	ND	ND	ND	
50	96/712595 II	M	70	DEDO DO PÉ	MM	P	MM Acral	0	0	0	4.2	V	0	0	F	H	0	0	0	0	0	N	ZG	0	0	0	12,01	V	ND	ND	ND	
51 AB	98/A22 + 98/004673	M	72	COURO CABELUDO	CARCINOMA ESPINOCELULAR	P	LM	Dest	E2	U	11.0	V	PN	0	F	Ves	1	0	L	SP	0	Ht	0	0	M2	0	ND	V	ND	ND	ND	
52 AB	99/347289 + 99/K473/14	M	60	FRONTAL	BASALIOMA	P	LM	Dest	E1	0	7.0	IV	PN	0	F+E+MC	Pleo	2	0	L	SUP	0	A	0	0	0	0	94,9	V	ND	ND	ND	
53 AB	99/356768 + 99/K2105	M	77	MALAR	TUMOR INFILTRATIVO	C	LM	Dest	E1	0	10.0	V	PN	0	Pleo+R	Pleo+Ves	4	0	0	SUP	0	A	ZG	0	M2	0	ND	V	ND	ND	ND	
54 ABCD	98/170846 + 98/K25011 + 99/167921 + 99/279848	M	64	MALAR	LM	P	LM	IF	E2	0	5.0	V	0	0	E+F	Ves+H	0	P1	0	SUP	0	N	ZG	0	0	0	105,16	V	0	0	0	
55 AB	96/773566 + 01/809436	F	80	PALPEBRA	LM	C	LM	Dest	E3	U	5.0	V	PN	0	F	Ves+H	0	P1	0	SUP	0	N	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND	
56	99/440439	M	69	COURO CABELUDO	LM	C	LM	IF	E1	0	2.0	V	0	0	F	Ves	0	0	L	0	0	N	0	0	0	0	30,1	V	ND	ND	ND	
57	99/458602	F	69	DORSO	BASALIOMA	C	0	Dest	E1	0	2.8	IV	PN	0	Pleo+F+E	Ves	6	0	L	0	0	A	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND	
58	99/507769	M	71	OMBRO	VERRUGA SEBORREICA	C	MMcS	Dest	0	U	4.0	IV	0	0	R	Ves	10	0	0	SUP	0	N	0	0	0	0	39,08	M	0	0	2001	

CASO Nº	LÂMINA Nº	SEXO	IDADE	LOCALIZAÇÃO	DIAGNÓSTICO CLÍNICO	DESMOPLASIA	MM in situ	INVASÃO FOLICULAR	ELASTOSE	ULCERAÇÃO	BRESLOW	CLARK	ENVOLVIMENTO NEURAL	INVASÃO VASCULAR	MELANOCITOS	NÚCLEOS	MITOSES	PIGMENTO	AGREGADOS LINFÓIDES	INFILTRADO INFLAMATORIO	REGRESSÃO	ESPESSURA EPIDERMICA	FAIXA DE GRENZ	NEVO ASSOCIADO	MUCINA	METAPLASIA ÓSSEA OU CARTILAGINEA	MESES DE SEGUIMENTO	VIVO/MORTO	RECIDIVA LOCAL	INVASÃO GANGLIONAR	METASTASES SISTEMICAS
59 AB	00/592438 + 00/619276	F	77	MALAR	LM	C	LM	IF	E2	0	6.0	IV/V	EN+PN	0	E+R	Ves	8	P1	0	SUP	0	A	0	0	0	0	84,34	V	0	0	0
60	00/629851	F	66	MALAR	ANGIOMA	C	Pag	0	E1	0	1.5	IV	PN	0	R	Ves	0	P2	L	0	0	N	ZG	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
61	00/709164	F	80	MALAR	ND	P	LM	IF	E2	0	1.75	IV	0	0	R	Ves	0	P1	L	0	0	A	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
62	00/730072+00/K2423 AND 00/K4441	F	48	ND	MMD	C	LM	0	0	0	2.7	III	0	0	F	Ves	0	P2	0	SP	0	N	ZG	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
63	00/738990	F	64	ND	ND	P	0	0	0	0	3.1	IV	0	0	F	Ves	0	0	0	SUP	0	Ht	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
64	00/746321	M	57	PESCOÇO	BASALIOMA	C	0	0	E3	U	1.7	IV	0	0	Pleo+F	Ves+H	0	0	L	SP	0	A	ZG	0	M2	0	76,55	V	ND	ND	ND
65	00/754650	F	59	LÁBIO	BASALIOMA	C	Tecas	0	E2	0	4.0	IV	PN	0	F	Ves	0	0	0	0	0	N	ZG	0	0	0	4,05	V	ND	ND	ND
66	00/760546	M	61	FRONTAL	MM	P	Pag+MMcS	IF	E1	0	0.6	III	0	0	F	Ves	0	P1	0	SUP	0	Ht	0	0	0	0	83,19	V	ND	ND	ND
67 ABC	00/801371 + 01/K728 + 02/039062	M	65	NARIZ	TUMOR INFILTRATIVO	P	LM	Dest	E1	0	3.2	IV	EN+PN	0	F	H	1	0	L	SUP	0	A	ZG	0	M1	0	25,66	V	0	0	0
68	01/K239	M	71	MENTO	INFILTRAÇÃO AVERMELHADA	C	0	0	E2	0	4.0	IV	0	0	Pleo+F	Ves	0	0	0	SUP	0	N	ZG	0	0	0	37,07	V	2001	0	2004
69	01/818338	F	65	ANTEBRAÇO	DOENÇA DE BOWEN	C	MMcS	0	E2	0	4.0	IV	EN+PN	0	F	Ves	0	0	0	SUP	Reg	Ht	0	0	0	0	65,1	V	0	0	0
70	01/824443	F	67	FRONTAL	BASALIOMA	C	Tecas	IF	E1	0	4.0	IV	0	0	F	H	0	0	0	0	0	Ht	0	0	0	0	0,95	V	ND	ND	ND
71	01/847979	F	80	MALAR	LM	P	LM	0	E2	0	3.0	IV/V	0	0	F	Ves	0	0	0	SUP	0	N	0	0	0	0	70,99	V	ND	ND	2007
72	01/857745	M	72	PRE-CLAVICULAR	BASALIOMA	C	MMcS+Tecas	Dest	E1	0	1.0	IV	0	0	F	Ves	0	P1	0	SUP	Reg	A	0	0	0	0	4,7	V	ND	ND	ND
73	02/044961	F	79	TEMPORAL	QUISTO	P	0	Dest	E2	0	9.0	V	PN	0	F	Ves	0	0	L	SP	0	N	ZG	0	0	0	1,78	V	ND	ND	ND
74 AB	02/262191 + 04/764362	M	60	MALAR	BASALIOMA	C	LM	Dest	E3	0	8.0	IV/V	EN	0	F	Ves	1	0	L	SUP	0	A	0	0	0	0	ND	V	0	0	2004
75	02/K454	M	86	ND	ND	P	S	Dest	E1	0	5.0	IV	PN	0	Pleo+F+MC	Ves+H	0	0	L	SP	Reg	A	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
<b>76</b>	<b>02/379434</b>	<b>M</b>	<b>81</b>	<b>FRONTAL</b>	<b>LM</b>	<b>P</b>	<b>Tecas</b>	<b>0</b>	<b>E2</b>	<b>0</b>	<b>5.0</b>	<b>V</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>F</b>	<b>Ves</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>A</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>ND</b>	<b>V</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
77	03/453209	F	67	NARIZ	BASALIOMA	C	LM	IF	0	0	2.0	IV	0	0	F	Ves	0	0	0	SUP	0	Ht	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
78	03/454736	F	72	MALAR	BASALIOMA	P	LM	IF	E2	0	6.0	IV/V	EN	0	Pleo	At+Ves	6	0	L	0	Reg	A	ZG	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
79	03/522387	F	84	BRAÇO	LM	C	0	Dest	E2	0	1.5	IV	0	0	F	Ves	0	P2	0	SP	Reg	A	ZG	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
80	03/541844	M	66	MALAR	TUMOR SUBCUTÂNEO	P	0	0	0	0	4.0	V	PN	0	F	Ves+H	0	0	L	SUP	0	N	0	0	0	0	47,6	V	ND	ND	ND
81	03/568132	F	74	NARIZ	GRANULOMATOSE	C	Pag	IF	E2	0	3.0	IV	0	0	F	Ves	0	0	0	0	Reg	A	ZG	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
82	03/648570	F	90	MALAR	QUISTO	P	AEp	Dest	E1	AEp	3.0	IV	0	0	F	H	1	0	0	SUP	0	AEp	AEp	0	M1	0	48,55	V	0	0	0
83	03/650285	F	82	MALAR	QUISTO	P	LM	0	E3	0	6.0	IV/V	PN	0	F	Ves	0	0	L	0	0	N	ZG	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
84	04/732189	F	46	SUB-ESCAPULAR	LIPOMA	P	Pag	Dest	0	0	11.0	IV/V	0	0	F	Ves	0	0	L	0	0	N	ZG	0	0	0	34,31	V	ND	ND	ND
85	04/738962	F	75	FRONTAL	BASALIOMA	P	LM	IF	E2	0	1.5	IV	0	0	F	Ves	0	P1	0	SUP	0	A	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
86	04/773355	F	64	PESCOÇO	MMcS	C	LM+Tecas	IF	0	0	2.8	IV	PN	0	F	Ves	0	P1	0	SUP	0	N	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
87	04/819175	M	75	ANTEBRAÇO	NEVO DISPLASICO	C	MMcS+Tecas	Dest	E3	0	1.75	IV	0	0	F	Ves	0	P1	0	SUP	Reg	A	ZG	0	0	0	34,21	V	0	0	ND
88	04/861851	M	79	ND	MM	P	MMcS+Tecas	0	E1	0	4.7	IV	PN	0	F+Pleo+R	Ves+H	1	P1	0	SUP	0	A	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND

CASO Nº	LÂMINA Nº	SEXO	IDADE	LOCALIZAÇÃO	DIAGNÓSTICO CLÍNICO	DESMOPLASIA	MM in situ	INVASÃO FOLICULAR	ELASTOSE	ULCERAÇÃO	BRESLOW	CLARK	ENVOLVIMENTO NEURAL	INVASÃO VASCULAR	MELANOCITOS	NÚCLEOS	MITOSES	PIGMENTO	AGREGADOS LINFÓIDES	INFILTRADO INFLAMATÓRIO	REGRESSÃO	ESPESSURA EPIDERME	FAIXA DE GRENZ	NEVO ASSOCIADO	MUCINA	MELANPLASIA ÓSSEA OU CARTILAGINEA	MESES DE SEGUIMENTO	VIVO/MORTO	RECIDIVA LOCAL	INVASÃO GANGLIONAR	METASTASES SISTÊMICAS
89	04/879694	M	58	ND	ND	P	LM	0	0	0	1.8	IV	0	0	F+Pleo+R	Ves+H	0	P1	0	0	0	Ht	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
90	04/925283	M	62	FRONTAL	NEVO ATÍPICO	P	LM+ Tecas	0	0	0	3.5	IV	PN	0	F	Ves	0	P1	L	0	0	Ht	ZG	0	0	0	6,84	V	ND	ND	ND
91	05/037625	M	86	DORSO	NEVO	P	MMcS	Dest	E1	0	2.0	IV	0	0	Pleo+F+R+MC	Ves+H	0	0	0	SUP	0	Ht	ZG	0	M1	0	21,78	V	ND	ND	ND
92 AB	05/047791 + 05/070220	F	65	OMBRO	QUERATOSE ACTÍNICA	P	0	0	E1	0	4.0	IV	0	0	F	Ves+H	0	0	L	0	0	N	ZG	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
93 AB	04/875973 + 01/K239	F	74	MANDIBULA	TUMOR	P	0	0	E3	0	2.3	V	EN+PN	0	F+Pleo+R	Ves+H	0	0	L	SUP	0	N	ZG	0	M2	0	169,21	V	ND	ND	ND
94	02/K740 OR LISBOA 02/1132	M	71	TRONCO	MM	C	0	Dest	0	U	7.0	IV	0	0	F	Ves	5	P1	L	0	0	N	0	0	0	0	12,01	M	ND	ND	ND
95	05/K1298	M	84	NARIZ	MM	P	MMcS+Tecas	IF	E1	0	6.0	IV	EN+PN	0	F	Ves	0	P2	0	0	0	A	0	0	M1	0	21,18	ND	ND	ND	ND
96	06/K155	F	63	MALAR	LM	C	LM+Tecas	IF	E2	0	3.1	IV/V	0	0	F	Ves	0	0	L	0	0	A	ZG	0	M2	0	ND	V	ND	ND	ND
97	06/K565	F	82	LÁBIO	BASALIOMA	C	MMcS+Tecas	0	E2	0	4.0	IV	0	0	F+MC	Ves	0	0	0	SP	0	A	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
98 AB	06/K721 + 06/K1941	M	66	LÁBIO	LEIOMIOMA	C	0	Dest	E2	U	10.0	V	EN+PN	IV	F+Pleo+R	Ves+H	0	0	L	SP	0	N	ZG	0	M2	0	ND	V	ND	ND	ND
99	06/K1616	M	86	RETRO-AURICULAR	ND	P	LM	Dest	E2	0	6.0	V	0	0	F	Ves	0	0	L	0	0	N	ZG	0	M2	0	ND	V	ND	ND	ND
100	06/K376923	M	66	OMBRO	QUELOIDE	P	MMcS	0	0	0	4.0	IV	0	0	H+F	H	0	0	0	SUP	0	A	BSE	0	0	0	12,57	V	0	0	0
101	06/453001	M	44	MALAR	NEVO	C	LM	IF	E2	0	3.0	IV	EN+PN	0	F	Ves	0	P1	0	SUP	0	Ht	ZG	0	M2	0	0,16	V	ND	ND	ND
102	06/456418	F	49	MALAR	NEVO	P	LM	Dest	E1	0	8.0	V	PN	0	F	Ves	0	P1	L	0	0	Ht	0	NA	0	0	ND	V	ND	ND	ND
103	04/766541	M	85	MALAR	FXA	C	0	Dest	E2	0	5.0	V	EN	0	Pleo+R	Ves	4	0	0	SUP	0	N	0	0	0	0	4,61	V	ND	ND	ND
104	04/836103	M	76	OMBRO	MM	P	MMcS	0	0	0	5.5	V	PN	0	F	Ves	0	0	L	0	0	N	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
105	04/837557	F	68	DORSO	CARCINOMA ESPINOCELULAR	P	0	Dest	0	U	7.0	IV/V	0	0	R	Ves	3	0	0	SUP	0	N	0	0	0	0	35,76	V	ND	ND	ND
106	95/440815	M	59	NARIZ	TUMOR	P	LM	0	E1	0	9.0	V	0	0	F	Ves	2	0	0	0	0	A	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
107	96/683170	M	79	NARIZ	ND	C	LM+Tecas	IF	E2	0	2.3	III	0	0	Ov	Ves	3	0	0	SUP	0	Ht	0	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
108	97/975611	F	62	MALAR	MM AMELANOTICO	P	LM	IF	E1	0	3.5	IV/V	0	0	F	Ves	1	0	L	SP	0	N	0	0	0	0	118,13	V	0	0	0
109 AB	99/416444 + 00/589758	M	64	MAMA	FOLICULITE	P	LM	Dest	0	0	5.4	IV	0	0	F+Pleo+R	Ves+H	4	0	L	SUP	0	Ht	ZG	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
110 AB	05/K2109 + 05/K2163	M	88	ND	ND	P	LM	0	0	0	9.0	V	EN	0	Pleo+F	Ves+H	3	0	L	SP	0	A	0	0	M1	0	24,8	V	ND	ND	ND
111	05/145939+05/308293	F	79	TEMPORAL	MM	C	LM	IF	E1	0	1.7	IV/V	0	0	F	H	0	P2	0	SP	0	A	ZG	0	0	0	ND	V	ND	ND	ND
112	06/364905	F	82	MALAR	MM	C	LM	Dest	E3	0	0.3	II	0	0	F	Ves	0	0	0	0	Reg	A	ZG	0	0	0	8,13	V	ND	ND	ND
113	06/484483	M	66	COURO CABELUDO	MMcS	P	0	0	E1	0	2.2	IV/V	0	0	F	Ves	0	P1	L	SP	0	A	0	0	0	0	13,06	V	ND	ND	ND