

KARINA MUNHOZ DE PAULA ALVES COELHO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* POR
IMUNO-HISTOQUÍMICA EM LESÕES MELANOCÍTIAS**

JOINVILLE
2017

KARINA MUNHOZ DE PAULA ALVES COELHO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* POR
IMUNO-HISTOQUÍMICA EM LESÕES MELANOCÍTICAS**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orientador: Professor Dr. Paulo Henrique Condeixa de França.

JOINVILLE
2017

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

C672a Coelho, Karina Munhoz de Paula Alves
Avaliação da expressão dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* por imuno-histoquímica em lesões melanocíticas/ Karina Munhoz de Paula Alves Coelho; orientador Dr. Paulo Henrique Condeixa de França. – Joinville: UNIVILLE, 2017.

75 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Melanoma. 2. Nevo displásico. 3. Imuno-histoquímica. 4. Diagnóstico. 5. Expressão gênica. I. França, Paulo Henrique Condeixa de (orient.). II. Título.

CDD 616.9940012

Termo de Aprovação

“Avaliação da Expressão dos Genes *CADMI*, *TWIST1* e *CDHI* por Imuno-
histoquímica em Lesões Melanocíticas”

por

Karina Munhoz de Paula Alves Coelho

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de
concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-
Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Orientador (UNIVILLE)

Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Orientador (UNIVILLE)

Prof. Dr. Caio Maurício Mendes de Cordova
(FURB)

Prof. Dr. Edson Sydney de Campos
(UNIVILLE)

Joinville, 03 de março de 2017

AGRADECIMENTO

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa (modalidade parcial) por meio do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares.

Ao orientador Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França pelo grande conhecimento transmitido. Sempre paciente, disponível e disposto a ajudar.

Ao Dr. Hercílio Fronza Júnior que participou de todas as etapas da construção deste estudo contribuindo com seu conhecimento e entusiasmo pelo desenvolvimento científico e pela pesquisa.

Aos membros da banca de avaliação, Dr. Caio Maurício Mendes de Córdova e Dr. Edson Sydney de Campos, que disponibilizaram do seu tempo para contribuir com seus conhecimentos para a conclusão deste estudo.

Ao Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos (CEDAP) que contribuiu com as amostras, estrutura e com o financiamento dos reagentes necessários a este estudo.

A todos os membros da equipe do CEDAP que contribuíram em diferentes fases deste estudo.

RESUMO

Introdução: O melanoma maligno é uma doença agressiva e sua incidência está aumentando no mundo. A predisposição genética e a exposição a fatores ambientais, principalmente a luz solar, são fatores de risco. A distinção histopatológica entre nevos e melanomas pode ser difícil. Prevê-se que a avaliação da expressão imuno-histoquímica de alguns genes poderia contribuir para o diagnóstico diferencial de lesões histologicamente questionáveis. *Objetivo:* Investigar se a avaliação da expressão imuno-histoquímica dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* (*E-caderina*), que participam dos mecanismos de adesão celular e transição epitelial-mesenquimal, contribui para o diagnóstico diferencial das lesões melanocíticas de difícil diagnóstico. *Metodologia:* Estudo transversal retrospectivo baseado na avaliação da expressão imuno-histoquímica dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* por imuno-histoquímica em amostras de 30 nevos compostos displásicos, 30 melanomas com menos de 1,0 mm de espessura e 30 melanomas com mais de 1,0 mm de espessura, diagnosticados no período de 2013 a 2016, em Joinville/SC. Foi utilizado um *score* que avaliou a intensidade da coloração e a proporção de células coradas. *Resultados:* Em comparação aos nevos melanocíticos compostos displásicos, observou-se redução significativa da expressão dos genes *CADM1* e *CDH1* nos melanomas (abaixo e acima de 1,0 mm de espessura) e nos melanomas de mais de 1,0 mm de espessura, respectivamente. Também se verificou menor expressão dos genes *CADM1* e *CDH1* nos melanomas com mais de 1,0 mm de espessura em relação aos melanomas com menos 1,0 mm. O gene *TWIST1* não apresentou diferença significativa da expressão entre os grupos. *Conclusão:* Estes achados permitem concluir que a expressão imuno-histoquímica do *CADM1* tem potencial para contribuir como ferramenta auxiliar ao diagnóstico diferencial entre nevos melanocíticos compostos displásicos e melanomas.

Palavras chave: Imuno-histoquímica, *CADM1*, *TWIST*, *CDH1*, melanoma, nevo displásico.

ABSTRACT

Introduction: Malignant melanoma is an aggressive disease and its incidence is increasing worldwide. Genetic predisposition and exposure to environmental factors, especially sunlight, are risk factors. Histopathologic distinction between nevi and melanoma can be difficult. It is anticipated that the evaluation of the immunohistochemical expression of some genes could contribute to the differential diagnosis of questionable histologically lesions. *Objective:* To investigate whether the evaluation of the immunohistochemical expression of genes *CADM1*, *TWIST1* and *CDH1* (*E-cadherin*), that take part in mechanisms of cell adhesion and epithelial-mesenchymal transition, contributes to the differential diagnosis of melanocytic lesions difficult to diagnose. *Methodology:* Retrospective cross-sectional study based on immunohistochemical expression evaluation of genes *CADM1*, *CDH1* and *TWIST1* in samples of 30 dysplastic compound nevus, 30 melanomas with less than 1.0 mm thick and melanomas with more than 1.0 mm thick, diagnosed between 2013 and 2016, in Joinville/SC. A score was used to evaluate color intensity and proportion of cells stained. *Results:* There was a significant reduction in the expression of the genes *CADM1* and *CDH1* in melanomas (below and above 1.0 mm thick) and in melanomas of more than 1.0 mm in thickness, respectively, compared to dysplastic melanocytic nevi. There was also lower expression of the genes *CADM1* and *CDH1* genes in melanomas greater than 1.0 mm thick compared to melanomas less than 1.0 mm. The gene *TWIST1* showed no significant difference in expression between groups. *Conclusion:* These findings allow us to conclude that the immunohistochemical expression of *CADM1* has the potential to contribute as an auxiliary tool to the differential diagnosis between dysplastic compound nevus and melanoma.

Key-words: immunohistochemistry, *CADM1*, *TWIST*, *CDH1*, cutaneous melanoma, dysplastic nevus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Melanócitos humanos confinados à camada basal da epiderme.	20
Figura 2:	Variação geográfica da incidência do melanoma no mundo.por 100.000 habitantes.	21
Figura 3:	Nevo melanocítico juncional. Proliferação de células névicas na junção dermo-epidérmica.	22
Figura 4:	Nevo melanocítico composto. Proliferação de células névicas na junção dermo-epidérmica e na derme.	23
Figura 5:	Nevo melanocítico intradérmico. Proliferação de células névicas na derme.....	23
Figura 6:	Nevo melanocítico juncional displásico. Presença de atipias celulares, hiperplasia melanocítica, fibrose lamelar, junção dos cones epidérmicos.....	24
Figura 7:	Melanoma de disseminação superficial. Presença de células frequentemente migrando para a superfície.....	25
Figura 8:	Lesão assimétrica com bordas irregulares e pigmentação variegada.....	26
Figura 9:	Fatores genéticos e ambientais que contribuem para o desenvolvimento do melanoma.....	26
Figura 10:	Paciente com múltiplos nevos displásicos.	27
Figura 11:	Radiação UV associada ao risco de melanoma pelo aumento miR21.....	29
Figura 12:	Vias de controle da proliferação celular e apoptose.....	30
Figura 13:	Vias de crescimento celular e de sobrevivência.....	31
Figura 14:	Aberrações moleculares na progressão do melanoma.....	33
Figura 15:	Via ERK durante a melanogênese que impacta na expressão fenotípica dos melanomas malignos.....	36
Figura 16:	Fatores de transcrição que controlam o mecanismo de transição epitelial-mesenquimal -TEM (EMT)	37
Figura 17:	Representação da expressão imuno-histoquímica dos níveis de	

	<i>CADM1</i> . Barra 1: melanoma cutâneo; Barra 2: nevo displásico; Barra 3: pele normal. Os melanomas mostram níveis mais baixos de expressão de <i>CADM1</i>	39
Figura 18:	<i>TWIST</i> inibe a E-caderina que é fundamental para o mecanismo de TEM (EMT).	42
Figura 19:	Modelo da via ERK1/2– <i>TWIST1</i> –MMP-1 na cascata do melanoma. A ativação do ERK1/2 leva a um aumento na transcrição do <i>TWIST1</i>	43
Figura 20:	(A e B) Ausência de expressão nuclear do <i>TWIST1</i> em nevos melanocíticos intradérmicos. (C e D) Metástase de melanoma em linfonodo mostrando imunorreatividade para <i>TWIST1</i>	44
Figura 21:	Aumento da expressão da N-caderina e diminuição da E-caderina no melanoma invasivo.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>	Comitê Americano Conjunto sobre Câncer
Akt	<i>Serine/threonine kinase 1</i>	Serina/treonina quinase 1
BAD	<i>BCL2-associated agonist of cell death</i>	Agonista de BCL2 associado à morte celular
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>	Linfoma de células B 2
BRAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma kinase B</i>	Quinase B do fibrossarcoma rapidamente acelerado
CADM1	<i>Cell adhesion molecule 1</i>	Molécula de adesão celular 1
CAPES		Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCND1	<i>Cyclin D1</i>	Ciclina D1
CDK4	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>	Ciclina dependente de quinase 4
CDK6	<i>Cyclin-dependent kinase 6</i>	Ciclina dependente de quinase 6
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2</i>	Inibidor de ciclina dependente de quinase 2
CEDAP		Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos
CEP		Comitê de Ética em Pesquisa
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>	Hibridização genômica comparativa
CNS		Conselho Nacional de Saúde
CONEP		Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Ácido desoxirribonucleico
FT-TEM		Fatores indutores da transição epitelial-mesenquimal
ErbB2	<i>Receptor tyrosine kinase 2</i>	Receptor de tirosina quinase 2
ErbB3	<i>Receptor tyrosine kinase 3</i>	Receptor de tirosina quinase 3
ERK	<i>Extracellular signal-regulated</i>	Quinase regulada por sinal

	<i>kinase</i>	extracelular
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
GSK1120212		Trametinib
HDM2	<i>Human double minute 2</i>	Duplo minuto 2 humano
HGNC	<i>HUGO Gene Nomenclature</i>	Nomenclatura de genes HUGO
HRAS	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene</i>	Oncogene Viral do Sarcoma do Rato Harvey
IGSF4A	<i>Immunoglobulin superfamily, member 4c</i>	Membro 4c da superfamília de imunoglobulina
IL-6	Interleukin 6	Interleucina 6
INCA		Instituto Nacional do Câncer
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>	Oncogene viral de sarcoma de rato Kirsten
MAPK	<i>Mitogen activated kinase-like protein</i>	Proteína tipo quinase ativada por mitógenos
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>	Duplo minuto 2 murino
MEK	<i>MAP kinase-ERK kinase</i>	MAP quinase-ERK quinase
Mel-CAM	<i>Melanoma cell adhesion molecule</i>	Molécula de adesão celular de melanoma
microRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i>	Micro ácido ribonucleico
miR-21	<i>Micro ribonucleic acid 21</i>	Micro ácido ribonucleico 21
MITF	<i>Microphthalmia-associated transcription</i>	Fator de transcrição associado à microftalmia
MMP2	<i>Matrix metalloproteinase-2</i>	Matriz metaloproteinase-2
MMP9	<i>Matrix metalloproteinase-9</i>	Matriz metaloproteinase-9
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NIH	<i>National Institutes of Health</i>	Institutos Nacionais de Saúde
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>	Homólogo do oncogene viral RAS do neuroblastoma

OMS		Organização Mundial da Saúde
p14ARF	<i>Alternate reading frame protein 14</i>	Proteína 14 de fase de leitura alternada
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>	Fosfatidilinositol 3-quinase
p16INK4a	<i>Kinase a inhibitor 16 protein</i>	Proteína 16 inibidora da quinase a
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Reação em Cadeia da Polimerase
PLX4032		Vemurafenib
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>	Homólogo de tensina e fosfatase
RAF	<i>Proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>	Proto-oncogene, serina/treonina quinase
SNAIL1	<i>Snail family transcriptional repressor 1</i>	Repressor transcripcional 1 da família caracol
SNAIL2	<i>Snail family transcriptional repressor 2</i>	Repressor transcripcional 2 da família caracol
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>	Pacote Estatístico para as Ciências Sociais
SYNCAM	<i>Synaptic adhesion molecule</i>	Molécula de adesão sináptica
TSLC1	<i>Tumor suppressor in lung cancer 1</i>	Supressor de tumor 1 no câncer de pulmão
TWIST1	<i>Twist Family Basic helix-loop-helix Transcription Factor 1</i>	Fator 1 de transcrição básico hélice-alça-hélice da família <i>TWIST</i>
TWIST2	<i>Twist Family Basic helix-loop-helix Transcription Factor 2</i>	Fator 2 de transcrição básico hélice-alça-hélice da família <i>TWIST</i>
UNIVILLE		Universidade da Região de Joinville
UV		Ultravioleta
UVA		Ultravioleta A
UVB		Ultravioleta B
UVC		Ultravioleta C
ZEB1	<i>Zinc Finger E-Box Binding</i>	Ligação dedo de zinco E-Box

ZEB2

Homeobox 1
Zinc Finger E-Box Binding
Homeobox 2

Homeobox 1
Ligação dedo de zinco E-Box
Homeobox 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	LESÕES MELANOCÍTICAS	19
3.1.1	Conceito	19
3.1.2	Epidemiologia	19
3.1.3	Classificação	22
3.1.3.1	Nevos	22
3.1.3.2	Melanomas	24
3.1.4	Fatores de risco	26
3.1.4.1	Fatores de risco genéticos	26
3.1.4.2	Fatores de risco ambientais	27
3.1.5	Patologia molecular	29
3.1.5.1	Patologia molecular dos melanomas	29
3.1.5.2	Patologia molecular dos nevos	32
3.1.5.3	Moléculas de adesão celular	34
3.1.5.4	Mecanismo de transição epitelial-mesenquimal	34
3.2	DIAGNÓSTICO DAS LESÕES MELANOCÍTICAS	37
3.2.1	Patologia molecular como auxiliar no diagnóstico	38
3.2.2	Marcadores de imuno-histoquímica	38
3.2.2.1	<i>CADM1</i>	39
3.2.2.2	<i>TWIST1</i>	41
3.2.2.3	<i>CDH1</i>	45
4	METODOLOGIA	47
4.1	TIPO DE ESTUDO	47
4.2	LOCAL DE ESTUDO	47
4.3	PERÍODO DO ESTUDO	47
4.4	AMOSTRAS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	47
4.5	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	48

4.5.1	TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	48
4.5.2	LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	50
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4.7	ASPECTOS ÉTICOS	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

O melanoma maligno é uma das doenças mais agressivas nos seres humanos. O número estimado de mortes por melanoma é de 48.000 por ano, em todo o mundo (ZHANG; LI, 2012) e há um aumento na incidência nas populações caucasianas (KISZNER et al., 2014).

O melanoma é muito resistente à quimioterapia convencional e apenas em torno de 14% de pacientes com doença metastática sobrevivem por 5 anos (ZHANG; LI, 2012). A remoção cirúrgica da lesão primária, antes das metástases, é o principal tratamento e o mais eficaz, embora a abordagem terapêutica do melanoma metastático já tenha terapias alvo (UGUEN et al., 2015).

A predisposição genética e a exposição a fatores ambientais aumentam o risco para melanoma. Indivíduos com histórico familiar comprovado tem risco significativamente maior para o desenvolvimento desta malignidade (JHAPPAN; NOONAN; MERLINO, 2003). A exposição ocupacional, o estilo nutricional e principalmente a exposição a luz solar são fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento do melanoma cutâneo. Mudanças significativas na expressão de micro ácido ribonucleico (microRNA) em resposta à exposição ambiental têm sido relatadas (MELNIK, 2015).

A precisão do diagnóstico do melanoma é crítica para a contenção da malignidade. Portanto, se pacientes com melanoma forem subdiagnosticados, eles podem ser inadequadamente tratados e estarem em risco potencial para a disseminação regional ou sistêmica da doença (ZHANG; LI, 2012).

O exame histopatológico permanece atualmente como "padrão ouro" para o diagnóstico de lesões melanocíticas. No entanto, a distinção histopatológica definitiva entre as lesões benignas e as malignas, em alguns casos, pode ser difícil (UGUEN et al., 2015). Apesar de várias características histológicas do melanoma terem sido descritas, muitos critérios se sobrepõem aos dos nevos displásicos e de outras formas de nevos benignos, como os nevos de Spitz. Portanto, o nível de discordância no diagnóstico de certas lesões melanocíticas pode ser elevado, mesmo quando examinados por patologistas experientes (KASHANI-SABET et al., 2009). É descrita uma discordância interobservador relativa ao diagnóstico de nevo e melanoma variando de 2,3 a 25% das lesões (UGUEN et al., 2015).

A expressão gênica pode ser útil para a classificação de neoplasias, definição de prognóstico e ainda como um marcador preditivo para terapia (KASHANI-SABET et al., 2009). Marcadores moleculares podem ser utilizados como ferramentas diagnósticas nas lesões melanocíticas uma vez que nevos e melanomas diferem pela ausência ou presença de aberrações cromossômicas (UGUEN et al., 2015). As vias de sinalização celular, controle do ciclo celular e de apoptose, dentre outras, têm sido implicadas no desenvolvimento do melanoma. Porém, há evidência que nevos benignos podem ser clonais e conter alterações genéticas predisponentes para o melanoma, como exemplo a mutação BRAF-V600E (quinase B do fibrossarcoma rapidamente acelerado, V600E). (KISZNER et al., 2014).

Ferramentas citogenéticas, tais como hibridização genômica comparativa (CGH) e a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) foram desenvolvidas para ajudar na classificação de lesões melanocíticas ambíguas. No entanto, estes métodos moleculares requerem equipamentos apropriados e patologistas qualificados, portanto, não são utilizados rotineiramente na maioria dos laboratórios (KASHANI-SABET et al., 2009).

Ao contrário, a imuno-histoquímica é difundida e utilizada na maioria dos centros de patologia. No entanto, nenhum dos marcadores isolados, ou mesmo um conjunto deles, até o momento, é suficiente para classificar inequivocamente uma lesão melanocítica como nevo ou melanoma (UGUEN et al., 2015).

Moléculas de adesão celular, incluindo as caderinas, integrinas e as da superfamília das imunoglobulinas estão envolvidas em um ou múltiplos passos da cascata de metástase (MCGARY; LEV; BAR-ELI, 2002). A E-caderina e a Molécula de adesão celular 1 (CADM1) são moléculas de adesão que tem demonstrado sua expressão anormal nos melanomas (REES, 2012).

A perda da E-caderina representa a marca da transição epitelial mesenquimal em tumores epiteliais e também é evidente nos estágios tardios do melanoma, especialmente em metástases nodais (CARMEL et al., 2013).

A perda da expressão imuno-histoquímica do *CADM1*, que frequentemente ocorre nos melanomas, indica que esta molécula de adesão poderia servir como um marcador de melanoma em lesões histologicamente questionáveis (YOU; ZHANG; ZHENG, 2012).

É descrito que os níveis de *CADM1* são inversamente relacionados aos níveis de expressão do gene do fator 1 de transcrição hélice-alça-hélice básico da família Twist (*TWIST1*) que é responsável por regular genes envolvidos na adesão celular (HARTSOUGH et al., 2015).

O *TWIST1* está envolvido no processo de transição epitelial mesenquimal (TEM) (KHAN et al., 2013) que é um processo onde as células perdem as propriedades de adesão e adquirem critérios mesenquimais, permitindo sua invasão e migração (BECK et al., 2015).

Portando, avaliar a expressão imuno-histoquímica em conjunto dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* (*E-caderina*) em nevos e melanomas é importante para determinar se estas moléculas podem auxiliar no diagnóstico diferencial das lesões melanocíticas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão imuno-histoquímica dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* em lesões melanocíticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar se a expressão imuno-histoquímica dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1*, nas lesões melanocíticas pode contribuir para o diagnóstico diferencial entre nevos melanocíticos compostos displásicos e melanomas;

Analisar a expressão imuno-histoquímica dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1*, em relação a espessura dos melanomas;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 LESÕES MELANOCÍTICAS

3.1.1 Conceito

As lesões melanocíticas caracterizam-se pela proliferação de melanócitos que são células derivadas da crista neural (GRANT-KELS, 2007). Os melanócitos estão na camada basal da epiderme ao lado de queratinócitos na proporção de 1:30 (Figura 1). A principal função dos melanócitos é proteger o ácido desoxirribonucleico (DNA) da radiação solar através da produção do pigmento melanina (PAPADOGGEORGAKIS, 2013).

As lesões benignas da linhagem melanocítica são denominadas de nevos melanocíticos e as lesões malignas de melanomas (BASTIAN, 2014). Os nevos displásicos são descritos como sendo um *continuum* entre nevo e melanoma porque eles são morfológica e biologicamente intermediários entre estas duas entidades (GOLDSTEIN; TUCKER, 2013)

O diagnóstico de nevo e melanoma é comum na prática anatomopatológica. Ainda assim, a familiaridade de tais proliferações nem sempre está ligada ao conforto interpretativo na determinação de suas propriedades biológicas (WICK; PATTERSON, 2005). O diagnóstico diferencial entre nevo, nevo displásico e melanoma, em muitos casos, pode ser desafiador (ZEMBOWICZ; PRIETO, 2010).

3.1.2 Epidemiologia

Os nevos são alterações melanocíticas cutâneas comuns, tendo em média entre 10 a 40 nevos por pessoa. Em contrapartida, o melanoma é muito menos frequente (MAGAÑA, 1994).

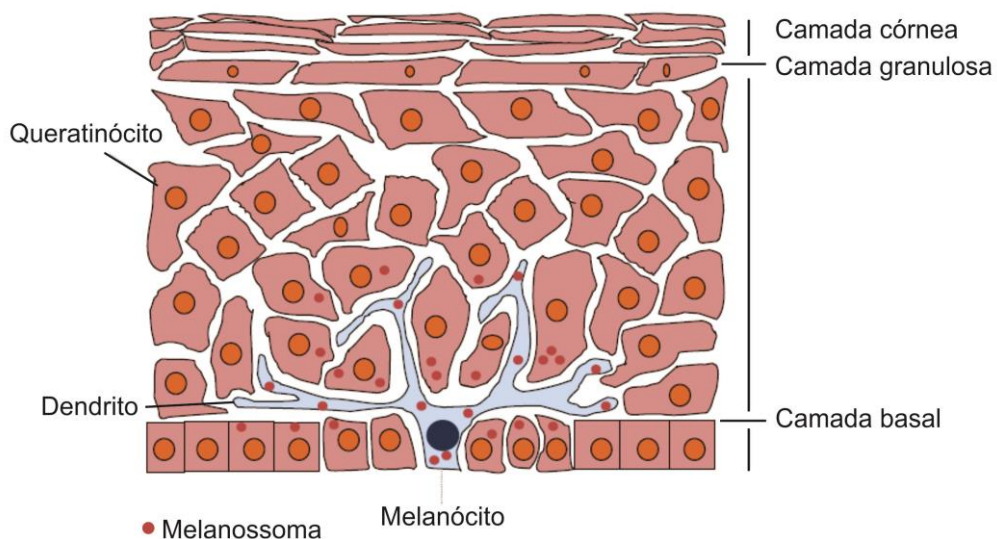


Figura 1. Melanócitos humanos confinados à camada basal da epiderme. Fonte: Adaptada de PAPADOGEORGAKIS, 2013.

Os nevos displásicos são relativamente comuns na população geral. Autores têm descrito uma prevalência variando de 2 a 53% em diferentes estudos, dependendo do critério diagnóstico (clínico e histológico). Uma estimativa mais acurada considera estar presente entre 2 a 8% dos caucasianos, apresentando-se frequentemente em indivíduos com menos do que 30 a 40 anos de idade. A frequência de nevo displásico em pacientes com história de melanoma é muito mais alta chegando a 59% (SILVA et al., 2011).

Apesar do melanoma não ser tão frequente quanto os carcinomas de pele, ele tem alta taxa de mortalidade, com mais de 2.000 mortes no Reino Unido, em 2011. Na Irlanda do Norte, o número de melanomas aumentou de 103 casos por ano entre 1984-1992 para 258 casos por ano entre 2004-2009 (MCCOURT; DOLAN; GORMLEY, 2014).

A *American Cancer Society* estima que para 2016, nos Estados Unidos da América (EUA), aproximadamente 87.110 novos melanomas serão diagnosticados, sendo 52.170 em homens e 34.940 em mulheres (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017)

O melanoma cutâneo representa aproximadamente 4% de todos os tumores malignos da pele e sua frequência está aumentando no Brasil e em muitos outros países (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

A distribuição global do melanoma demonstra a importância da radiação ultravioleta (UV) na patogênese desta doença. Países que estão localizados em latitudes mais perto da linha do Equador tem maiores taxas de melanoma em pessoas de pele clara. Altitude elevada é também um fator de risco para o desenvolvimento de melanoma, presumivelmente, porque a radiação UV é maior devido a uma menor interferência entre a energia solar e material particulado presente na atmosfera. Embora a latitude e a altitude possuam um papel fundamental para desenvolvimento do melanoma, o fototipo também é um componente importante para explicar as variações na incidência de melanoma em todo o mundo. A América Central, apesar de estar mais perto do equador do que a América do Norte, tem uma taxa de incidência mais baixa presumivelmente devido o predomínio de pele mais escura (Figura 2) (HAWRYLUK; FISHER, 2011)

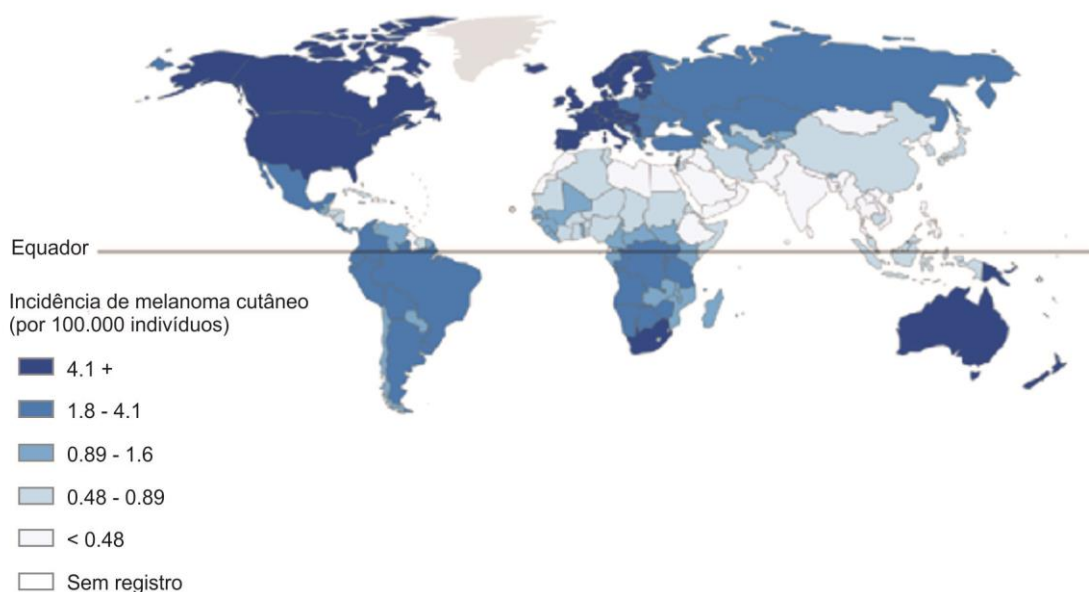


Figura. 2 Variação geográfica da incidência de melanoma no mundo por 100.000 habitantes
Fonte: Adaptada de HAWRYLUK; FISHER, 2011.

Conforme estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2016 no Brasil, o melanoma afetará de 4 a 6 pessoas por 100.000 habitantes e com incidência mais alta nas regiões sul e sudeste (COSTA; FERNANDES; BORGES, 2015).

Um estudo que avaliou as características dos melanomas em Joinville/SC, no período de 2003 a 2014, encontrou uma incidência elevada em comparação aos índices do Brasil. Uma das explicações para esse achado é que Joinville é habitada predominantemente por população de pele clara que vive próximo ao litoral onde, muitas vezes, tem atividades recreativas com exposição solar de modo intermitente, numa área com relativa rarefação da camada de ozônio e com alto Índice de radiação UV (STEGLISH, 2015).

3.1.3 Classificação

Os nevos são lesões melanocíticas benignas e os melanomas lesões melanocíticas malignas (BASTIAN, 2014). O melanoma *in situ* e o lentigo maligno são consideradas lesões pré-malignas (MCCOURT; DOLAN; GORMLEY, 2014) e os nevos displásicos são descritos como sendo lesões intermediárias entre nevo e melanoma (GOLDSTEIN; TUCKER, 2013).

3.1.3.1 Nevos

Os nevos podem ser adquiridos, que são os mais comuns e possuem três estágios histológicos: juncional (Figura 3), composto (Figura 4) e intradérmico (Figura 5). Os nevos podem ser congênitos que são aqueles presentes ao nascimento e correspondem em torno de 1% de todos os nevos. Há nevos melanocíticos fusiformes que se encontram na derme entre os feixes de colágenos e excepcionalmente se associam com melanoma (MAGAÑA, 1994).

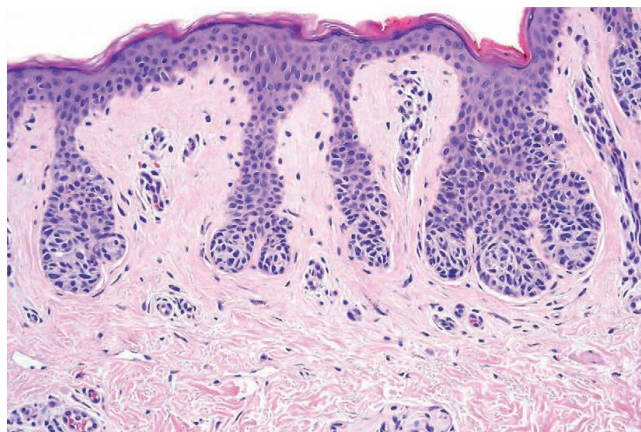


Figura 3. Nevo melanocítico juncional. Proliferação de células névicas na junção dermo-epidérmica. Fonte: MACKEE, 2012.

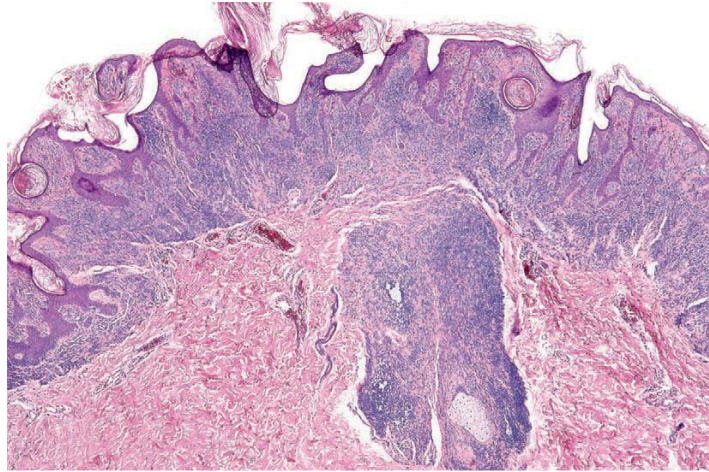


Figura. 4. Nevo melanocítico composto. Proliferação de células névicas na junção dermo-epidérmica e na derme. Fonte: MACKEE, 2012.

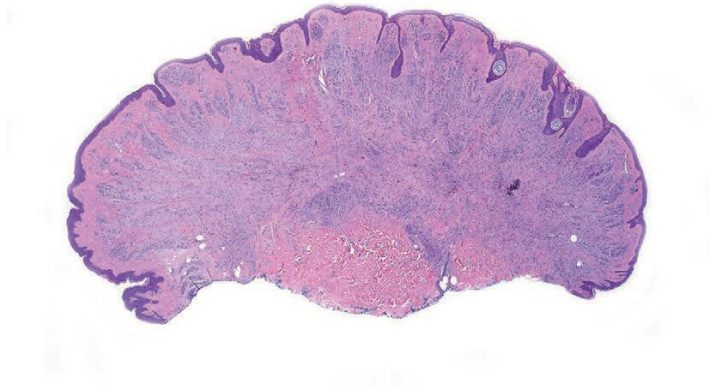


Figura. 5. Nevo melanocítico intradérmico. Proliferação de células névicas na derme. Fonte: MACKEE, 2012.

Os nevos ainda são classificados como displásicos baseados em características clínicas e histopatológicas (DUFFY; GROSSMAN, 2012a).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o *National Institutes of Health* (NIH), o diagnóstico histopatológico de nevos displásicos é baseado em critérios maiores (mandatórios) e critérios menores (pelo menos dois precisam estar presentes). Os critérios maiores são hiperplasia melanocítica contígua ou lentiginosa e atipia focal melanocítica. Os critérios menores são fenômeno de “ombro”, fusão epitelial dos cones, fibrose lamelar concêntrica subepidérmica e infiltrado inflamatório linfocítico perivascular superficial (Figura 6) (SILVA et al., 2011).

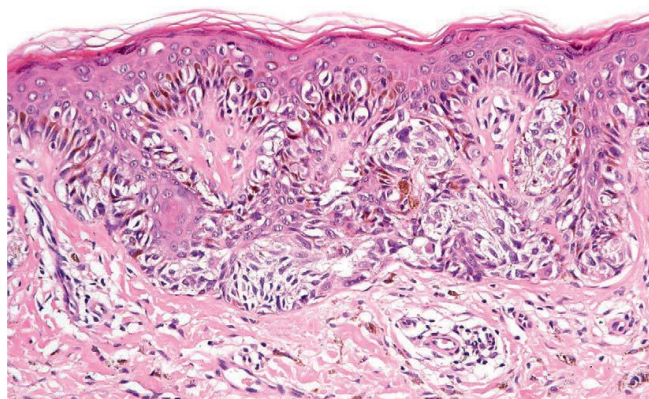


Figura 6. Nevo melanocítico juncional displásico. Presença de atipias celulares, hiperplasia melanocítica, fibrose lamelar, junção dos cones epidérmicos. Fonte: MACKEE, 2012.

A presença de 100 ou mais nevos com pelo menos um nevo com diâmetro maior do que 8 mm e um nevo com características clínicas de atipia, em pacientes com antecedente familiar de melanoma cutâneo, caracteriza a síndrome do nevo atípico clássica, descrita por Clark (CLARK et al., 1978). No entanto, a definição dessa síndrome é controversa. Em 1992 o NHI definiu esta síndrome como sendo a ocorrência de melanoma em pelo menos um parente de primeiro ou segundo grau, grande quantidade de nevos (mais de 50), sendo alguns clinicamente atípicos e com características histológicas distintas (REZZE; LEON; DUPRAT, 2010).

3.1.3.2 Melanomas

O melanoma compreende subtipos relacionados a diferentes características clínicas, histológicas e a localizações anatômicas. A OMS baseia-se na classificação proposta por Clark há quase 30 anos que utiliza aspectos morfológicos para diferenciá-lo em quatro tipos principais: melanoma de disseminação superficial, o mais frequente (Figura 7), lentigo maligno melanoma, melanoma nodular e melanoma acral lentiginoso (BASTIAN, 2014).

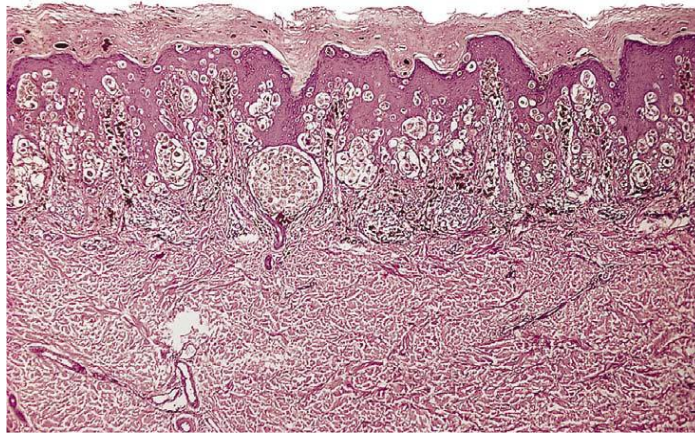


Figura 7. Melanoma de disseminação superficial. Presença de células frequentemente migrando para a superfície. Fonte: WEEDON, 2010.

O Colégio Americano de Patologistas utiliza a classificação da OMS modificada, que inclui os seguintes subtipos: melanoma de disseminação superficial, melanoma nodular, lentigo maligno melanoma, melanoma lentiginoso acral, melanoma lentiginoso de mucosa, melanoma desmoplásico neurotrópico, melanoma com origem em nevo azul, melanoma com origem em nevo congênito gigante, melanoma da infância, melanoma nevoide, melanoma sem outra classificação (FRISHBERG et al., 2009) (LAGA; MURPHY, 2010).

Os melanomas são caracterizados clinicamente pela presença de mácula hiperocrômica com variação na coloração e bordas irregulares (COSTA; FERNANDES; BORGES, 2015). As lesões pigmentadas são avaliadas pelo mnemônico ABCDE (Figura 8) que inclui assimetria, irregularidade nos bordos, variação na cor, diâmetro maior que 5 mm e evolução (SHIRAZI et al., 2015). A sensibilidade do diagnóstico clínico dos melanomas para dermatologistas experientes é relatada em torno de 70% (GARBE et al., 2012). A associação da dermatoscopia pode aumentar a sensibilidade para 90% e apresentar com especificidade de 50% (BOURNE et al., 2012).

Os critérios que formam a base do esquema de estadiamento incluem espessura do tumor primário, ulceração, mitoses, metástases. A classificação T baseia-se na espessura do tumor: menor ou igual a 1 mm, maior que 1 a 2 mm, maior que 2 a 4 mm e superior a 4 mm (DUNCAN, 2009).



Figura 8. Lesão assimétrica com bordas irregulares e pigmentação variegada. Fonte: MCCOURT; DOLAN; GORMLEY, 2014.

3.1.4 Fatores de risco

O risco significativo para o desenvolvimento de melanoma em humanos está associado à predisposição genética e a exposição a fatores ambientais (Figura 9) (JHAPPAN; NOONAN; MERLINO, 2003).

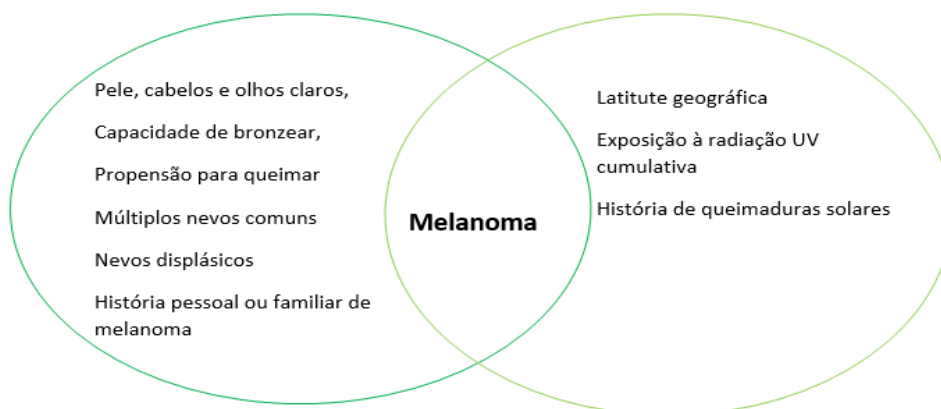


Figura 9. Fatores genéticos e ambientais que contribuem para o desenvolvimento do melanoma. Fonte: PSATY et al., 2010.

3.1.4.1 Fatores de risco genéticos

Em 1820, Norris descreveu o que atualmente é considerado predisposição familiar ao melanoma. Em 1978, Clark, relatou um aumento da incidência de

melanoma cutâneo em famílias com múltiplas lesões melanocíticas (Figura 10), introduzindo o modelo de progressão do tumor de melanoma a partir de nevo melanocítico. Na época, Clark usou o termo síndrome B-K usando as iniciais dos sobrenomes de pacientes. Atualmente, os termos síndrome do nevo displásico e síndrome familiar do nevo displásico/melanoma tem sido utilizado. Em 1985, Elder estendeu a teoria do “nevo-melanoma” para nevos displásicos esporádicos como um possível precursor de melanoma esporádico (SILVA et al., 2011).



Figura 10. Paciente com múltiplos nevos displásicos. Fonte: (PSATY et al., 2010)

Pode-se argumentar que o melanoma tem um componente genético, uma vez que os fatores de risco hereditários, como características físicas tais como pele clara, cabelos ruivos, olhos azuis e a síndrome familiar do nevo displásico-melanoma são determinados geneticamente (TSAO et al., 2012). Além disso, a história pessoal de melanoma aumenta o risco para um segundo melanoma. Sabe-se que de 1 a 8%, ou mais, dos pacientes com história prévia de melanoma vão desenvolver múltiplos melanomas primários e o risco de um segundo melanoma primário aumenta para 19% entre pacientes com história familiar positiva (PSATY et al., 2010).

3.1.4.2 Fatores de risco ambientais

Dos fatores de risco ambientais para o desenvolvimento do melanoma, a luz solar é considerada a principal causa (BRESSAC-DE-PAILLERETS et al., 2002).

A radiação UV, que está associada ao desenvolvimento do melanoma, pode ser classificada em UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (100-280 nm). A UVC e a maioria dos comprimentos de onda UVB são bloqueados pela camada de ozônio e apenas uma fração de UVB e UVA atinge a superfície da Terra (MCCOURT; DOLAN; GORMLEY, 2014).

O aumento dos melanomas que ocorreu nos últimos anos foi associado com a depleção da camada de ozônio, que resulta em maior radiação UVB alcançando a Terra. No entanto, estudos afirmam que a maioria dos melanomas, em torno de 92%, são decorrentes de danos indiretos ao DNA, causados pela radiação UVA, supondo-se que a depleção da camada de ozônio não é a responsável pelo aumento radical dos melanomas nos últimos anos (VOLKOVOVA et al., 2012).

Na lesão direta ao DNA, a radiação UVB faz com que haja a formação de ligações covalentes entre os pares de bases de citosina e timina no DNA e forma dímeros de pirimidina (dímero de ciclobutano). Na lesão indireta ao DNA, há absorção da radiação UVA por moléculas fotossensibilizadoras que transferem energia para moléculas de oxigênio que se transformam em oxigênio singlete, que é altamente reativo (VOLKOVOVA et al., 2012). Diversas são as moléculas fotossensibilizadoras, dentre elas o dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) e dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina (NADPH), ácido urocânico e esteróis (ANNA et al., 2007).

A eficácia dos protetores solares que agem somente contra a radiação UVB é discutida, uma vez que por evitar a queimadura, eles proporcionam maior tempo de exposição solar aos raios UVA (WOODHEAD; SETLOW; TANAKA, 1999).

Fatores ambientais que aumentam o risco de melanoma, tais como a radiação, estão associados com o aumento do micro ácido ribonucleico (21miR-21) que é um oncomiR. O aumento da expressão de miR-21 tem sido observado durante a transição de uma lesão melanocítica benigna para o melanoma maligno. Mutações comuns no melanoma como genes BRAF e o homólogo do oncogene viral RAS do neuroblastoma (NRAS) estão associadas ao aumento da expressão de miR-21, que afeta genes alvo resultando em proliferação, diminuição da apoptose, instabilidade genética, aumento do estresse oxidativo, angiogênese, invasão e metástase (Figura 11) (MELNIK, 2015).

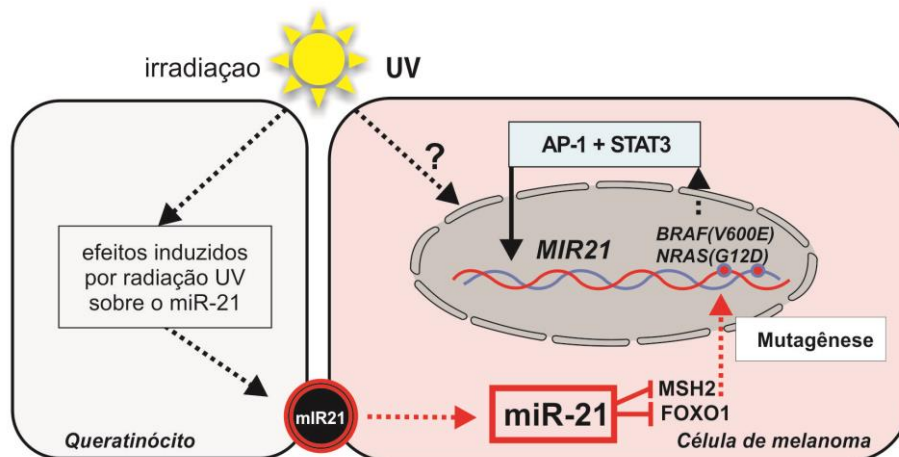


Figura 11. Radiação UV associada ao risco de melanoma pelo aumento miR21. Fonte: Adaptada de MELNIK, 2015.

3.1.5 Patologia molecular

3.1.5.1 Patologia molecular dos melanomas

Os mecanismos patogênicos do desenvolvimento do melanoma não estão totalmente estabelecidos, mas sabe-se que vários genes e vias metabólicas estão ativados (PALMIERI et al., 2009).

A progressão do melanoma está associada com ativação de oncogenes e com eventos epigenéticos (YAJIMA et al., 2012). A ativação dos oncogenes pode ocorrer por mutação genética, deleção, amplificação ou translocação. Os eventos epigenéticos, que são mudanças reversíveis e não provocam alterações na sequência de DNA, geralmente resultam da modulação transcricional por metilação de DNA e/ou por alterações na cromatina, como a modificação das histonas (PALMIERI et al., 2009).

Os melanomas não mostram o mesmo cenário primário de eventos clonais, mas alguns destes eventos são mais comuns do que outros. Algumas vias de sinalização são mais conhecidas e geralmente controlam a proliferação celular, a apoptose e a senescência celular (BENNETT, 2008).

A via proteíno-quinase ativada por mitogênio/quinase regulada por sinal extracelular (MAPK/ERK) participa do controle da proliferação celular (PALMIERI et al., 2009). Esta via de sinalização é regulada pelos receptores da tirosina quinase, citocinas e receptores acoplados à proteína G (MOZURAITIENE et al., 2015).

A ativação da via fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K) desempenha um papel significativo no melanoma, frequentemente em um cenário da ativação concorrente da via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK (MOZURAITIENE et al., 2015).

O gene supressor de tumor homólogo de tensina e fosfatase (*PTEN*) codifica um lipídeo e uma proteína fosfatase que regulam o crescimento celular e a sobrevivência através da sinalização do fosfatidilinositol 3-quinase/serina/treonina quinase (PI3K/AKT). AKT é um gene que envia sinais inibitórios que promovem o crescimento e a sobrevivência celular. No melanoma, níveis elevados de fosfo-AKT podem correlacionar adversamente com a sobrevivência do paciente (TSAO et al., 2012). PTEN, contendo um domínio fosfatase, está inativado em 12% dos melanomas através de mutação ou metilação (YAJIMA et al., 2012).

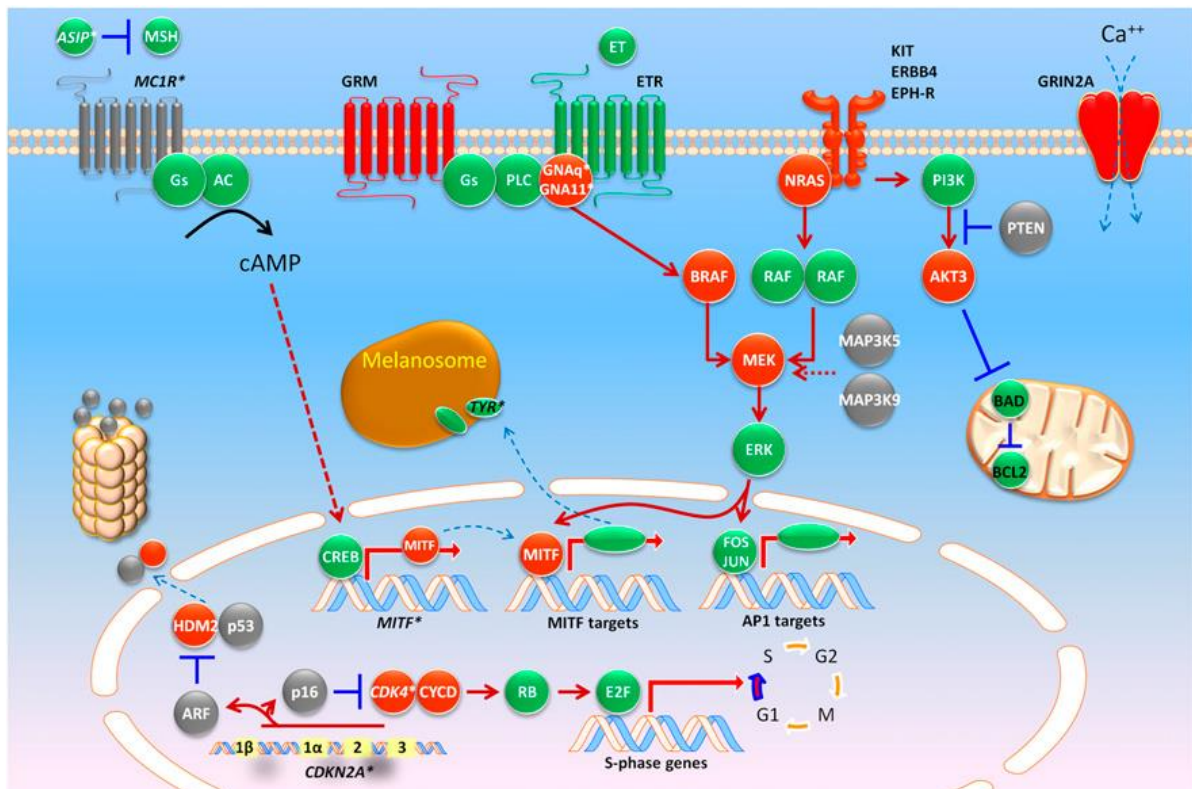


Figura 13. Vias de crescimento celular e de sobrevivência. Fonte: (TSAO et al., 2012).

A senescência celular, que é uma barreira para o desenvolvimento do melanoma, corresponde a uma interrupção irreversível da proliferação de células somáticas que é induzida por encurtamento dos telômeros e estresse oncogênico (BENNETT, 2008).

A redução no comprimento dos telômeros parece exercer danos a sinalização do DNA pela ativação de proteína p16^{CDKN2A}. Portanto, os melanomas não podem crescer indefinidamente sem um mecanismo para reduzir os telômeros. A expressão e a atividade das telomerasas é de fato inibida na progressão do melanoma (PALMIERI et al., 2009).

A via de supressão de tumor do inibidor da ciclina dependente de quinase 2A (*CDKN2A*), gene envolvido na patogênese do melanoma, codifica duas proteínas, p16INK4a e p14ARF. A perda da função da p16INK4a promove ativação da ciclina dependente de quinase (CDK4) e ciclina dependente de quinase 6 (CDK6) resultando em hiperfosforilação da proteína do retinoblastoma promovendo a proliferação celular (Figura 12). A perda da função no locus *CDKN2A* é a anomalia genética mais frequente no melanoma familiar, cerca de 40% dos casos, e nos pacientes sem história ocorre em cerca de 8,2% dos indivíduos (MOZURAITIENE et al., 2015).

Nos melanomas a inativação da via de p53 supressora de tumor ocorre mais frequentemente pela via *CDKN2A* devido a perda da função de seu produto p14ARF que previne a degradação da p53 pela proteína E3 ubiquitina ligase MDM2 (Figura 12) (MOZURAITIENE et al., 2015). As mutações diretas em p53 são infrequentes nos melanomas; uma meta-análise com 645 espécimes de melanoma revelou mutação direta em apenas 85 dos casos (13,2%) (TSAO et al., 2012).

Os melanomas comumente resistem à indução de apoptose e parecem estar protegidos por múltiplos mecanismos que incluem a ativação das vias MAPK e PI3K/AKT. No melanoma, a via MAPK antagoniza a apoptose por múltiplos mecanismos que incluem a expressão anti-apoptótica do BCL2 (*B-cell lymphoma 2*), através do fator de transcrição associado à microftalmia (MITF) e da supressão da proteína proapoptótica agonista de BCL2 da morte celular (*BAD*) (Figura 13) (TSAO et al., 2012).

3.1.5.2 Patologia molecular dos nevos

Estudos relatam que existe clonalidade em 81% de nevos, sendo que destes 25% são displásicos. No entanto, a demonstração de clonalidade não informa se o nevo displásico se originou *de novo* ou de um nevo comum pré-existente, uma vez

que em ambas as circunstâncias as células se originariam a partir de uma única progenitora (Figura 14) (DUFFY; GROSSMAN; TANAKA, 2012a).

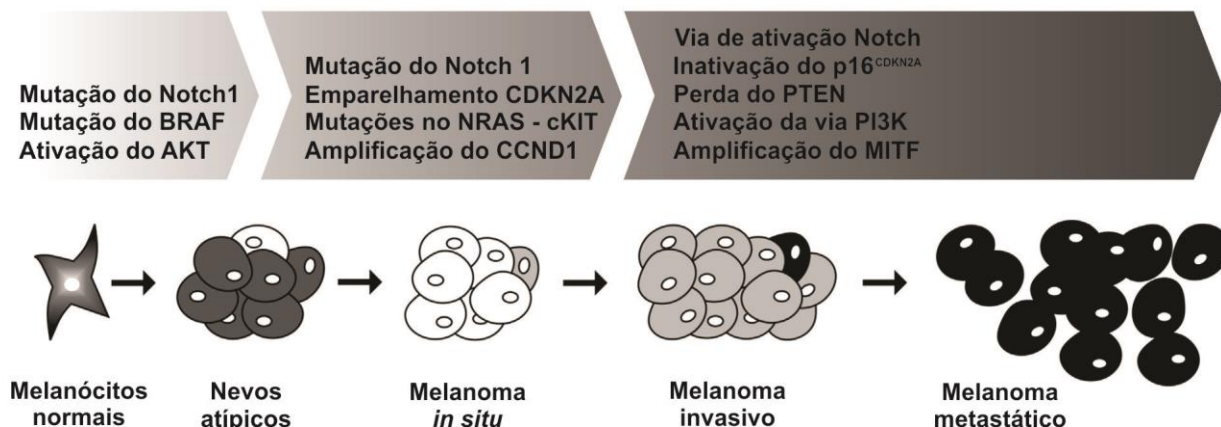


Figura 14. Aberrações moleculares na progressão do melanoma. Fonte: Adaptada de MOZURAITIENE et al., 2015)

As mutações BRAF ocorrem em mais de 80% dos nevos melanocíticos, sugerindo que estas alterações somáticas possam ocorrer cedo na melanogênese (MOZURAITIENE et al., 2015).

A mutação BRAF tem sido detectada em torno de 62 a 67% dos nevos displásicos. No entanto, não há correlação entre mutação BRAF e a ativação da MAPK (DUFFY; GROSSMAN; TANAKA, 2012b). A mutação V600E que é prevalente no melanoma, no câncer colorretal e no cancer de tireoide, não é identificada com a mesma frequência nos nevos (TSAO et al., 2012).

Em contraste com os nevos congênitos, que comumente possuem a mutação RAS, esta mutação raramente está presente nos nevos displásicos, sendo identificada em apenas 1 de 19 casos e 1 de 18 casos, em dois estudos realizados (DUFFY; GROSSMAN; TANAKA, 2012b).

Alguns nevos displásicos exibem alterações em p16 ou p53. Um estudo encontrou três nevos displásicos com mutações de p16 entre doze nevos examinados. Diferenças significativas entre nevos displásicos e nevos comuns não são observadas (DUFFY; GROSSMAN; TANAKA, 2012b). A mutações no gene *Tp53* é muito menor nos nevos displásicos do que nos melanomas. O acúmulo da proteína p53 nos nevos displásicos tem sido reportado com uma frequência muito menor que nos melanomas, em torno de 5% a 15% (HUSSEIN; WOOD, 2002).

Na síndrome familiar do nevo displásico-melanoma as mutações em CDKN2A assim como CDK4 e ARF, tem sido demonstradas por participar do desenvolvimento da doença (PSATY et al., 2010).

3.1.5.3 Moléculas de adesão celular

As moléculas de adesão celular participam de processos biológicos importantes como a diferenciação, crescimento, proliferação e migração celular (REES, 2012). As moléculas de adesão celular como as caderinas, as integrinas e as da superfamília de imunoglobulinas participam dos processos de crescimento e metástase do melanoma maligno (MCGARY; LEV; BAR-ELI, 2002).

A molécula de adesão celular do melanoma (Mel-CAM) pertence à superfamília das imunoglobulinas. Mel-CAM não é expressa em melanócitos normais, mas é expressa em nevos benignos e em melanomas. A interação entre Mel-CAM e seus receptores pode induzir sinais celulares necessários para a progressão do tumor. No entanto, a molécula de adesão celular do melanoma não é útil na distinção entre lesões melanocíticas benignas e malignas (FIGUEIREDO et al., 2003).

Integrinas são proteínas transmembrana que funcionam principalmente pela migração e aderência a células na matriz extracelular, bem como a outras células. A integrina avb3 esta associada com a progressão do melanoma e pode ser usada no diagnóstico para distinguir nevo benigno do melanoma maligno (FIGUEIREDO et al., 2003).

A E-caderina é uma molécula de adesão celular que está envolvida nas interações queratinócito-melanócito. A perda da expressão da E-caderina tem sido relatada na progressão e metástase dos melanomas cutâneos (ANNA et al., 2007).

A molécula de adesão celular 1 (CADM1) é uma proteína de adesão que tem sido demonstrada estar reprimida em tecidos tumorigênicos e sua expressão imunohistoquímica anormal tem sido relatada nos melanomas (REES, 2012).

3.1.5.4 Mecanismo de transição epitelial mesenquimal

Transição epitelial-mesenquimal (TEM) é um termo que se refere a eventos de desenvolvimento como os que ocorrem na gastrulação e na segregação da crista

neural quando as células emergem de um epitélio e se tornam isoladas (fibroblastos-*like*) (BENNETT, 2008).

Este processo biológico permite que uma célula epitelial, que interage com a membrana basal, submeta-se a múltiplas alterações bioquímicas que lhe permitam assumir fenótipo celular mesenquimal, que inclui aumento na capacidade migratória e de invasão, resistência à apoptose e maior produção de componentes da matriz extracelular (KALLURI; WEINBERG, 2009).

O mecanismo de TEM está associado à capacidade de invasividade dos cânceres, incluindo a do melanoma (BENNETT, 2008). No entanto, é fundamental entender que o mecanismo de TEM clássico, como descrito nos carcinomas e no desenvolvimento embrionário, não existe nos melanomas (PAPADOGEORGAKIS, 2013).

A linhagem melanocítica evolui a partir da crista neural com células embrionárias reguladas pela TEM (CAMEL et al., 2013) (TULCHINSKY et al., 2013). Nas lesões melanocíticas o mecanismo de TEM refere-se à transformação de melanócitos em vez de células epiteliais. Os melanócitos transformados adquirem um número muito grande de modificações moleculares, incluindo a perda gradual de moléculas de adesão celular como as caderinas (PAPADOGEORGAKIS, 2013).

Uma das características do mecanismo de TEM, nas células epiteliais, é a regulação negativa da E-caderina que está relacionada ao aumento da expressão de caderina mesenquimal neuronal (N-caderina), o que resulta em alteração da adesão celular, onde as células epiteliais adquirem afinidade por células mesenquimais através de interações com N-caderina (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014).

Um paradoxo é que os melanócitos adquirem um fenótipo que tanto a E-caderina, um marcador de células epiteliais, como a vimentina, uma proteína de filamento intermediário sintetizado principalmente por células de origem mesenquimal, são fortemente expressas. Portanto, os melanócitos não são nem células epiteliais nem mesenquimais e podem ser melhor classificados como um tipo de célula mista exibindo propriedades de ambas (PAPADOGEORGAKIS, 2013).

O mecanismo de TEM é controlado por vários fatores de transcrição, incluindo TWIST1, TWIST2, o repressor transcripcional 1 da família *snail* (SNAIL1), repressor transcripcional 2 da família *snail* (SNAIL2) e ligação dedo de zinco E-Box homeobox

1 (ZEB1) e ligação dedo de zinco E-Box homeobox 2 (ZEB2) (Figura. 15) (TULCHINSKY et al., 2013).

A regulação das funções dos fatores indutores de transcrição da transição epitelial-mesenquimal (FT-TEM) nos melanomas malignos é diferente do epitélio (CARMEL et al., 2013). Estudos mostram que os melanócitos normais são positivos para SNAIL2 e ZEB2, mas negativos para ZEB1 e TWIST1 (TULCHINSKY et al., 2013). SNAIL2 e ZEB2 se comportam como proteínas supressoras de tumores através da ativação de uma via de diferenciação de melanócitos dependente de MITF (Figura. 15) (CARMEL et al., 2013).

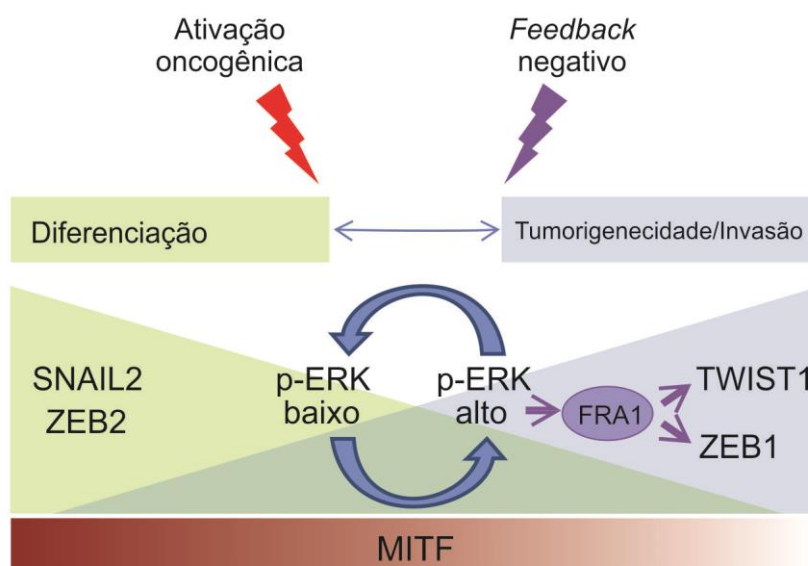


Figura 15. Via ERK durante a melanogênese que impacta na expressão fenotípica dos melanomas malignos. Fonte: Adaptada de TULCHINSKY et al., 2013.

Ativação de NRAS/BRAF media a TEM em um estágio tardio do melanoma (MOZURAITIENE et al., 2015). Em resposta a ativação de NRAS/BRAF, a TEM sofre uma reorganização em favor de TWIST1. Esta chave reversível coopera com BRAF na promoção da desdiferenciação e transformação neoplásica dos melanócitos. Esta chave resulta em perda de E-caderina e constitui um fator de mau prognóstico em pacientes com melanoma (Figura 16) (CARMEL et al., 2013).

As alterações das interações de células com a matriz extracelular são essenciais para a iniciação e progressão da TME. As alterações nas integrinas durante TME correlacionam-se com a expressão aumentada das proteases, tais

como metaloproteinase 2 (MMP2) e metaloproteinase (MMP9) (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014).

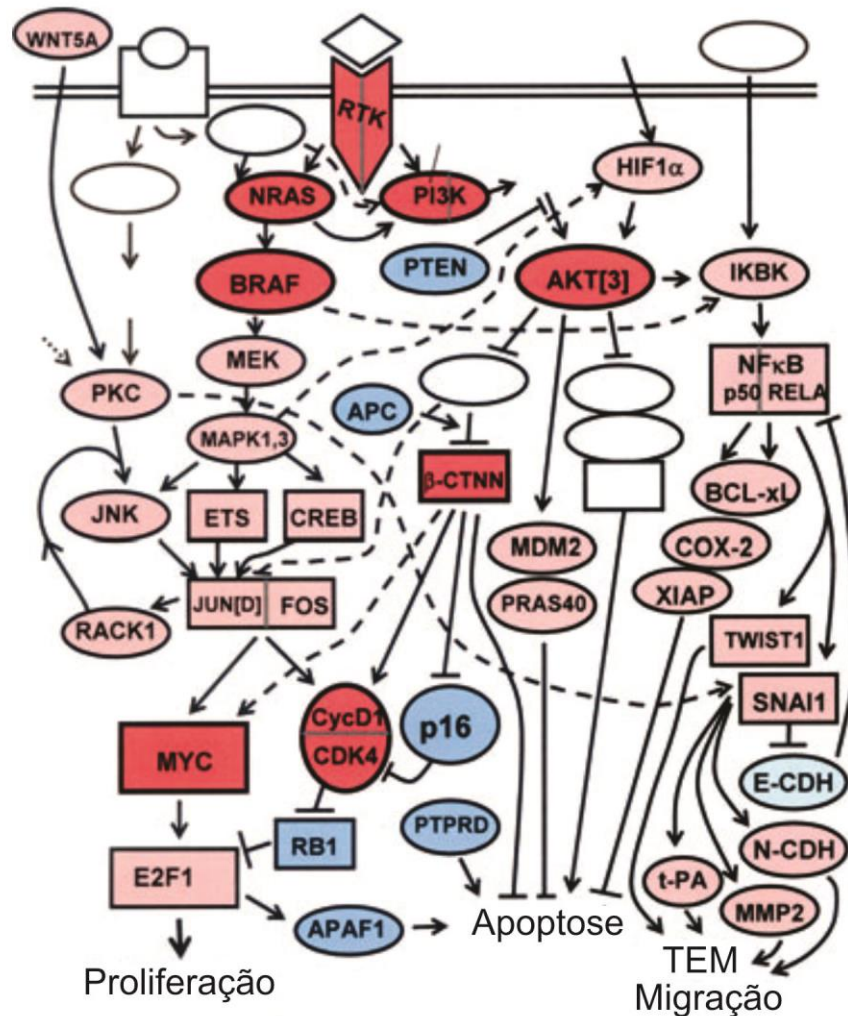


Figura 16. Fatores de transcrição que controlam o mecanismo de transição epitelial-mesenquimal -TEM (EMT). Fonte: Adaptada de (BENNETT, 2008).

3.2 DIAGNÓSTICO DE LESÕES MELANOCÍTICAS

O diagnóstico histológico das proliferações melanocíticas é inerentemente difícil, necessitando de integração de múltiplos critérios arquiteturais e citológicos. Nenhum critério isolado é diagnóstico desta entidade particular uma vez que critérios similares podem ser encontrados em nevos benignos e melanomas. Estudos

complementares tem potencial para auxiliar na categorização dos tumores melanocíticos (ZEMBOWICZ; SCOLYER, 2011).

3.2.1 Patologia molecular como auxiliar no diagnóstico

A análise histopatológica dos tecidos corados por hematoxilina e eosina, em correlação com o contexto clínico, é o padrão ouro para o diagnóstico de melanoma. No entanto, há um subgrupo de lesões com achados histopatológicos conflitantes. Por este motivo, patologistas tem explorado técnicas complementares para aumentar a acurácia diagnóstica das lesões melanocíticas. Métodos citogenéticos podem ser usados para a distinção entre nevos e melanomas, dentre eles o FISH e o CGH (BUSAM, 2013).

Além dos métodos citogenéticos, a imuno-histoquímica tem um papel importante no diagnóstico de lesões melanocíticas. No entanto, não há um único marcador, ou a combinação deles que estabeleça um diagnóstico preciso de melanoma ou nevo (PRIETO; SHEA, 2011).

3.2.2 Marcadores de imuno-histoquímica

Nas lesões em que os critérios clínicos e histopatológicos de melanoma sobrepõem aos do nevo, a imuno-histoquímica pode ser sugerida para auxiliar na diferenciação destes casos de difícil diagnóstico. (PALIT; INAMADAR, 2011).

Dentre os marcadores utilizados para a distinção entre nevo e melanoma, o HMB-45 e o Ki-67 tem sido descritos como sendo os mais úteis. Quando o padrão de expressão é intraepitelial ou periepitelial e quase completamente ausente na derme profunda, estas lesões são mais consistentes com nevo que com melanoma. O Ki-67, que expressa o índice proliferativo, geralmente é menor que 1% nos nevos e maior que 10% nos melanomas (PRIETO; SHEA, 2011).

Estudos tem mostrado que a perda da expressão imuno-histoquímica do *CADM1* frequentemente ocorre nos melanomas e pode servir como um marcador para o diagnóstico diferencial das lesões melanocíticas histologicamente questionáveis (YOU et al., 2012). Há evidências que o *CADM1* é regulado negativamente pelo *TWIST1* que pode agir como um supressor da invasão do

melanoma (HARTSOUGH et al, 2015). Na progressão do melanoma ocorre a perda da função de E-caderina e ganho na expressão de N-caderina (FERNANDES, 2011).

3.2.2.1 *CADM1*

O *CADM1*, um gene localizado no cromossomo 11q23.2, recebeu o nome oficial de *cell adhesion molecule 1* (*CADM1*) pelo *Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee* (LIANG et al., 2011) No entanto, este gene é conhecido também como: membro 4c da muperfamília de imunoglobulina (IGSF4); gene supressor de tumor 1, no câncer de pulmão (TSLC1); molécula de adesão sináptica (SYNCAM) (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2017).

A perda ou a redução da expressão do *CADM1* está envolvida na progressão e metástase de diferentes tipos de neoplasias, incluindo o carcinoma de pulmão, estômago, ovário, pâncreas, mama e leucemia de células T (YOU et al., 2014). No melanoma é descrita a sua expressão diminuída pelo método de imuno-histoquímica (Figura 17) (REES, 2012).

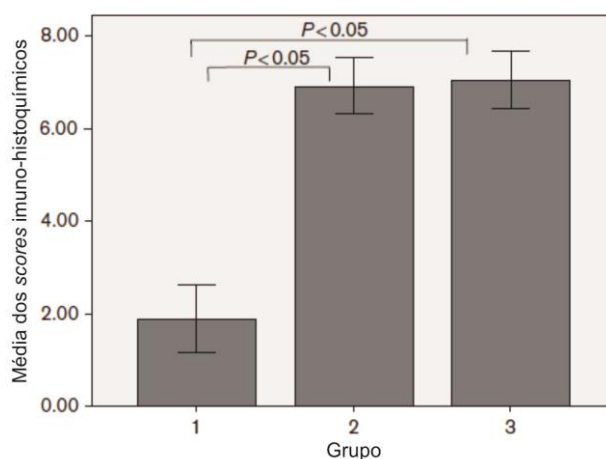


Figura 17. Representação da expressão imuno-histoquímica dos níveis de *CADM1*. Barra 1: melanoma cutâneo; Barra 2: nevo displásico; Barra 3: pele normal. Os melanomas mostram níveis mais baixos de expressão de *CADM1*. Fonte: Adaptada de YOU et al., 2012

A *CADM1* faz parte de uma ampla categoria de moléculas de adesão celular que facilitam as ligações célula a célula e célula matriz extracelular. Elas são

capazes também de transmitir sinais mecânicos e químicos através da membrana. A sinalização mediada pelas moléculas de adesão é importante na regulação de muitos processos celulares incluindo a diferenciação, a proliferação e a migração celular (REES, 2012).

O CADM1 é uma glicoproteína transmembrana com 442 aminoácidos, composta por um domínio extracelular do tipo imunoglobulina e um domínio intracelular citoplasmático (LIANG et al., 2011).

O domínio extracelular é homólogo a outros da superfamília das imunoglobulinas de moléculas de adesão celular (CAM) e funcionalmente serve como mediador para a formação de homodímeros de CADM1 ou de heterodímeros de outros membros das moléculas de adesão celular. Estudos demonstraram que o CADM1 está envolvido na adesão celular através de interações homofílicas, independentes de cálcio e magnésio. Portanto, é provável que o CADM1 seja um supressor de tumor pelo seu domínio extracelular melhorando a adesão entre células, suprimindo a invasão e metástase (LIANG et al., 2011).

No entanto, existem evidências que o domínio intracelular do CADM1 também desempenha um papel importante na supressão tumoral, interagindo com proteínas citoplasmáticas (LIANG et al., 2011). Acredita-se que CADM1 possa estar relacionado com a actina do citoesqueleto citoplasmático para uma ligação estável entre as células (YOU et al., 2010).

Os mecanismos exatos do CADM1 associados a supressão do crescimento tumoral e de metástases no melanoma ainda permanecem elusivos (YOU et al., 2014). Sabe-se que a perda da expressão do CADM1, tem como principal mecanismo subjacente a hipermetilação do gene promotor ou a perda da heterozigose, que frequentemente se correlaciona com pior prognóstico das neoplasias (VAN DER WEYDEN et al., 2012).

A perda da função do CADM1 presumivelmente conduz a rompimentos na adesão célula a célula e célula matriz extracelular, levando a uma proliferação celular descontrolada e a distorção progressiva da arquitetura normal do tecido, transformando nevos displásicos de um fenótipo benigno para maligno (YOU et al., 2012).

O CADM1 pode executar a função supressora de tumores por desencadear a resposta imunológica citotóxica dos linfócitos NK e T CD8 (MURAKAMI, 2005). Os

mecanismos pelos quais as células tumorais interagem com o sistema imunológico permanecem pouco compreendidos. Um estudo observou que os efeitos supressores do *CADM1* estavam ausentes em camundongos sem imunidade mediada por linfócitos T. Portanto, os dados deste estudo sugerem que a função do *CADM1* na supressão de metástases acontece pelos mecanismos de vigilância imunológica (FARAJI et al., 2012).

O *CADM1* inibe a ligação do receptor de tirosina quinase 2 com receptor de tirosina quinase 3 (2ErbB2/ErbB3), sinalizando a morte celular, suprimindo o tumor. O miR-214 suprime o *CADM1* e aumenta a ligação ErbB2/ErbB3, observado no câncer colorretal (MOMOSE et al., 2013).

Observou-se, em um estudo *in vitro*, que o *CADM1* inibe a invasão de células de melanoma através da supressão da matriz metaloproteinase. A degradação da matriz extracelular e da membrana basal pode ser facilitada pelas metaloproteinases que são enzimas proteolíticas associadas à invasão tumoral por facilitarem a migração de células tumorais através da matriz extracelular (YOU et al., 2014).

Os níveis de *CADM1* são inversamente relacionados aos níveis de *TWIST1*, que é responsável por regular genes envolvidos na adesão celular. Demonstrou-se que o *TWIST1* interage fisicamente com o promotor de *CADM1* reduzindo seus níveis, sugerindo que o *CADM1* é negativamente regulado pelo *TWIST1* (HARTSOUGH et al, 2015).

A perda da função de uma molécula de adesão celular como a *CADM1* pode induzir invasão e metástase, em células cancerosas, através da intervenção no mecanismo de transição epitelial-mesenquimal (EMT) (NATIONAL CANCER CENTER RESEARCH INSTITUTE JAPAN, 2017).

Sabe-se que há perda da expressão do *CADM1* no citoplasma de melanomas e que esta perda está associada com estágios tardios do tumor e com o decréscimo na sobrevida dos pacientes, apesar de nenhum mecanismo exato ainda ter sido determinado (REES, 2012). Portanto, o *CADM1* pode constituir um marcador prognóstico importante e um potencial alvo para o desenvolvimento de novas terapias (YOU et al., 2014).

3.2.2.2 *TWIST1*

O gene *TWIST1* está localizado no cromossomo 7p21.2 e é conhecido também como TWIST ou fator de transcrição TWIST (ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN, 2017). Ele é um fator de transcrição *basic helix-loop-helix* (bHLH) que forma tanto homodímeros quanto heterodímeros com outras proteínas bHLH para a construção de uma sequência core E-box na região do promotor de genes alvo (SINGH; GRAMOLINI, 2009).

O *TWIST* é um regulador nuclear na morfogênese embriológica (QIANG et al., 2014) e participa do desenvolvimento da mesoderme, da miogênese, da neurogênese e também age como um regulador de metástases (SINGH; GRAMOLINI, 2009).

É conhecida a superexpressão do *TWIST* em tumores de diferentes origens, como sarcomas, gliomas, carcinomas de células escamosas, carcinomas da mama e melanoma (BECK et al., 2015). Esta superexpressão tem sido associada ao aumento da migração celular, invasão e metástase de neoplasias. O *TWIST1* está ativado na maioria dos melanomas e este achado correlaciona-se com pior sobrevida dos pacientes (WEISS et al., 2012).

O *TWIST* está envolvido no processo de transição epitelial mesenquimal (TEM) que desencadeia uma função essencial nas metástases dos cânceres (KHAN et al., 2013). Na TEM as células epiteliais perdem as propriedades de adesão e adquirem critérios mesenquimais permitindo sua migração e invasão (BECK et al., 2015). O TWIST ativa a N-caderina e inibe a E-caderina que são importantes para a TEM (Figura 18) (KHAN et al., 2013).

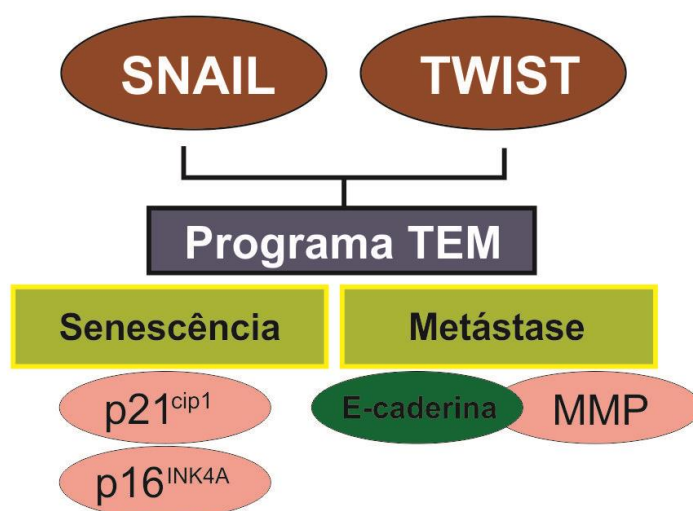


Figura 18. TWIST inibe a E-caderina que é fundamental para o mecanismo de TEM (EMT).
Fonte: Adaptada de WANG; ZHOU, 2011.

Existem evidências que a IL-6 induza a TEM e aumente a capacidade de invasão das células tumorais de origem epitelial. No entanto, não se sabe se a IL-6 afeta tumores mesenquimais. Um estudo examinou os efeitos da IL-6 nas células de melanoma e encontrou que a IL-6 pode aumentar seu potencial metastático por regular a expressão do *TWIST* e N-caderina (NA; LEE; SEOK, 2013).

Encontrou-se que RAS-RAF-MEK-ERK (via ERK1/2) sinaliza o aumento da expressão de *TWIST1* que aumenta as propriedades de invasão na derme e, pelo menos em parte, eleva os níveis da matriz metaloproteinase (Figura 19) (HARTSOUGH, et al, 2015). A hiperativação desta via é comum em múltiplos tipos de câncer, especialmente no melanoma, onde mutações N-RAS ou B-RAF são prevalentes (WEISS et al., 2012).

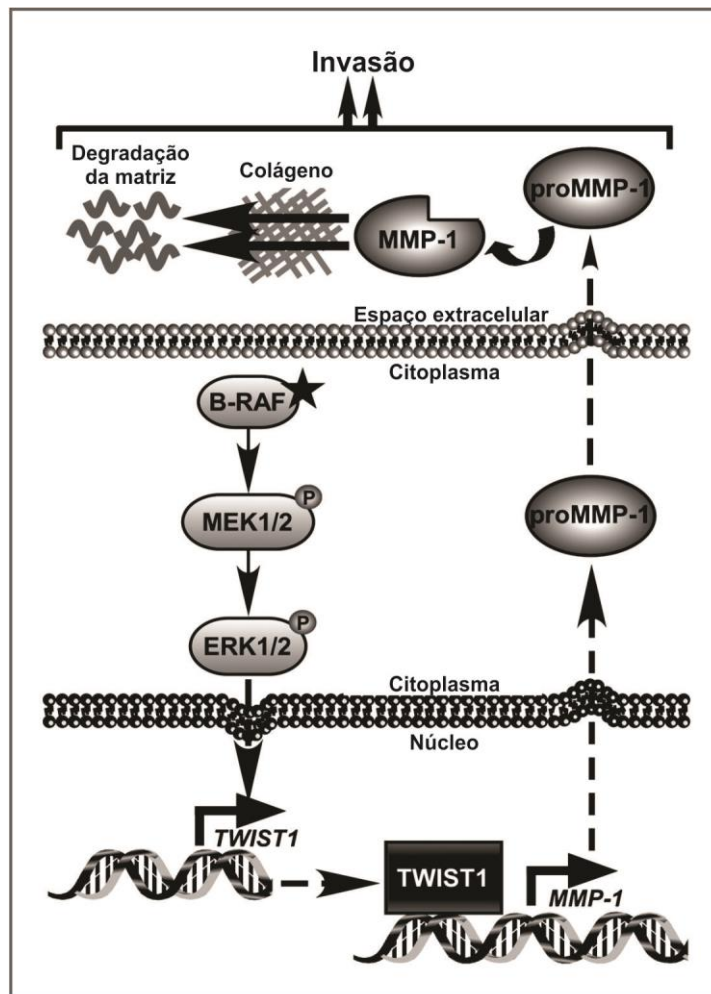


Figura 19. Modelo da via ERK1/2–TWIST1–MMP-1 na cascata do melanoma. A ativação do ERK1/2 leva a um aumento na transcrição do *TWIST1*. Fonte: Adaptada de (WEISS et al., 2012)

A superexpressão do *TWIST* também protege as células de câncer da morte por apoptose (KHAN et al., 2013) através da inibição da p53 (BECK et al., 2015). O *TWIST* pode afetar indiretamente a p53 através da modulação da via ARF/MDM/p53 (MAESTRO et al., 1999).

A associação da expressão do *TWIST1* em lesões metastáticas de melanoma, incluindo metástases nodais e a distância, foi relatada. Observou-se também que a coloração forte nuclear do *TWIST* está presente na maioria dos melanomas primários, enquanto que a expressão do *TWIST* geralmente é negativa em lesões benignas (Figura 20) (PAPADOGEORGAKIS, 2013).

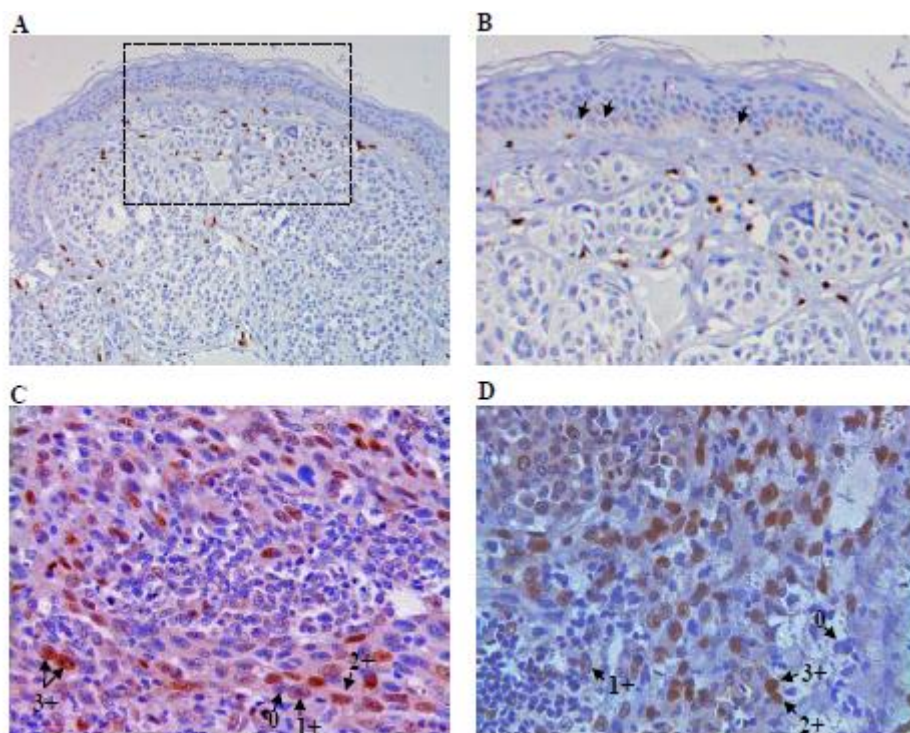


Figura 20. (A e B) Ausência de expressão nuclear do *TWIST1* em nevos melanocíticos intradérmicos. (C e D) Metástase de melanoma em linfonodo mostrando imunorreatividade para *TWIST1*. (PAPADOGEORGAKIS, 2013).

Um estudo mostrou que (TGF) beta-1 se combinado com PLX4032, um inibidor de BRAF, ou GSK1120212, um inibidor de MEK, aumenta substancialmente a morte celular em linhagens de células de melanoma com mutação BRAF. Este estudo sugere que o *TWIST* desempenha uma função crucial mediando resistência às drogas inibidoras moleculares de BRAF e MEK (MENON et al., 2013). O

desenvolvimento de terapias alvo envolvendo o *TWIST* tem uma grande promessa na terapêutica do câncer (KHAN et al., 2013).

3.2.2.3 *CDH1* (E-caderina)

O gene *CDH1* tem o nome oficial de *cadherin 1*, pelo HGNC e sinônimo de *E-cadherin* (HUGO GENE NOMENCLATURE COMMITTEE, 2017). Este gene está presente no cromossomo 16 e codifica uma caderina clássica da superfamília das caderinas. Esta é uma proteína de adesão célula-célula que contém região extracelular, transmembrana e citoplasmática. A perda da função deste gene contribui para progressão, invasão e/ou metástases (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2017).

Caderinas são glicoproteínas transmembrana cálcio dependentes que mediam a adesão célula-célula. A E-caderina está envolvida nas interações queratinócito-melanócito. A perda da expressão da E-caderina tem sido relatada na progressão e metástase dos melanomas cutâneos. A proteína β -catenina se liga a E-caderina no citoesqueleto desempenhando um papel importante na adesão celular (ANNA et al., 2007).

O *TWIST1* suprime a E-caderina. (PAPADOGEORGAKIS, 2013). A perda da E-caderina representa a marca da TEM em tumores epiteliais e também é evidente nos estágios tardios do melanoma, especialmente em metástases nodais (CAMEL et al., 2013). O mecanismo de transição epitelial mesenquimal (TEM) nas células de melanoma ocorre pela modulação de genes específicos, reprimindo a E-caderina e induzindo a N-caderina e proteases (BENNETT, 2008). Na progressão do melanoma ocorre a perda da função de E-caderina e ganho na expressão de N-caderina (Figura 21) (FERNANDES, 2011).

A expressão de N-caderina facilita a ligação de células melanocíticas com fibroblastos e com células endoteliais, facilitando o extravasamento das células de melanoma para a circulação. A E-caderina ativada retarda o crescimento e pode reverter o fenótipo invasivo de células do melanoma. Porém, não existem evidências de que a diminuição de E-caderina funcione como um promotor do melanoma (FERNANDES, 2011).

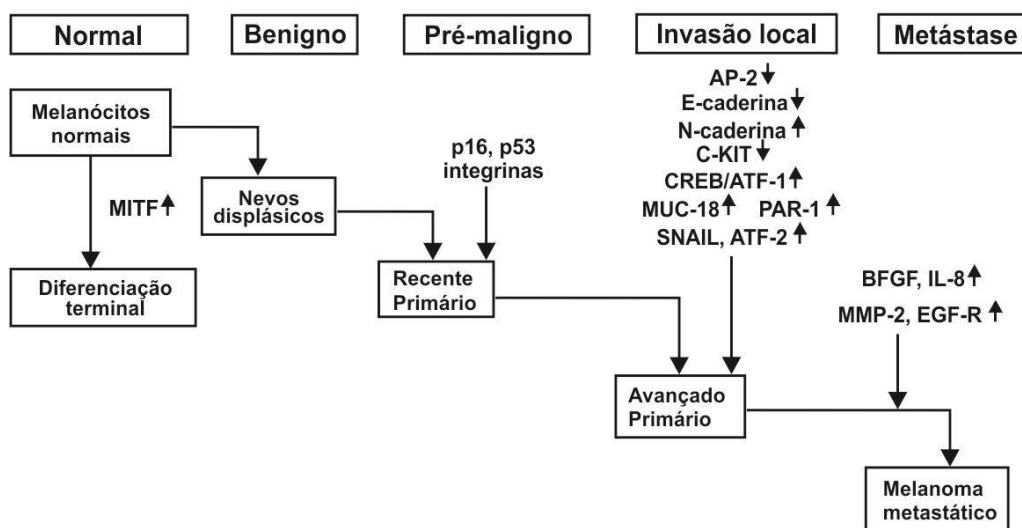


Figura 21. Aumento da expressão da N-caderina e diminuição da E-caderina no melanoma invasivo. Fonte: Adaptada de MCGARY; LEV; BAR-ELI, 2002

4. METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo transversal retrospectivo para a investigação da expressão imuno-histoquímica dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1*.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos (CEDAP), Laboratório de Anatomia Patológica, localizado na cidade de Joinville em Santa Catarina, credenciado pelo Colégio Americano de Patologistas e pela Organização Nacional de Acreditação. Possui uma equipe com 10 patologistas e 70 colaboradores e atua na área de anatomia patológica, incluindo a citopatologia, histopatologia, imuno-histoquímica, imunofluorescência e patologia molecular. Atende pacientes principalmente da região norte do estado, sendo que aproximadamente metade são provenientes da rede pública de saúde. Devido a sua abrangência de atendimento, o CEDAP constitui um local apropriado para estudos de lesões melanocíticas, incluindo os melanomas, que são prevalentes na região norte (STEGGLISH, 2015).

4.3 PERÍODO DO ESTUDO

O estudo foi realizado em amostras coletadas nos anos de 2013, 2014, 2015 e 2016. A reavaliação histológica e as análises imuno-histoquímicas foram realizadas no período de maio de 2016 a janeiro de 2017.

4.4 AMOSTRAS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram selecionadas amostras a partir dos diagnósticos registrados no banco de dados do CEDAP. Os pacientes eram provenientes da rede pública e privada e todos tinham indicação clínica para a realização do procedimento.

Inicialmente foram selecionadas 120 amostras consecutivas, todas com acordo diagnóstico de dois patologistas, sendo 40 amostras de melanomas com

menos de 1,0 mm de espessura, 40 melanomas com mais de 1,0 mm de espessura e 40 nevos melanocíticos compostos displásicos, com atipias moderadas. Foram excluídas as amostras que não apresentavam material suficiente para as análises subsequentes e as amostras que na reavaliação histológica apresentaram critérios diagnósticos duvidosos, totalizando 18 exclusões (9 amostras de melanomas com menos de 1,0 mm de espessura, 4 de melanomas com mais de 1,0 mm de espessura e 5 de nevos melanocíticos). Por fim, para fins do estudo foram incluídas as 30 amostras consecutivas com diagnósticos mais recentes de cada grupo

Dentre os melanomas com menos de 1,0 mm de espessura, a média de idade foi 51 ± 17 anos. Conforme a classificação histológica do Colégio Americano de Patologistas, 27 eram de disseminação superficial e 3 melanomas sem outra classificação. A média da espessura foi de $0,5 \text{ mm} \pm 0,3 \text{ mm}$. Dentre os melanomas com mais de 1,0 mm de espessura, a média de idade foi 60 ± 14 anos. Dez eram do tipo histológico de disseminação superficial, 14 do tipo nodular, 1 melanoma acral, 1 melanoma nevoide e 4 melanomas, sem outra classificação. A média da espessura foi de $3,9 \text{ mm} \pm 3,8 \text{ mm}$. Dentre os nevos melanocíticos compostos displásicos, com atipias moderadas, a média de idade foi 40 ± 13 anos e todos tinham a informação clínica ou de análise macroscópica de diâmetro maior que 5,0 mm.

4.5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

As lâminas das amostras selecionadas, coradas por hematoxilina e eosina foram reanalisadas microscopicamente para a confirmação do diagnóstico histológico. Os blocos de parafina correspondentes foram analisados macroscopicamente para avaliação da quantidade de material presente.

4.5.1 Técnica de imuno-histoquímica

As amostras foram previamente fixadas em formalina a 10% e dispostas em blocos de parafina. Foram realizados cortes com espessura de 4 micrômetros e dispostos em lâminas silanizadas e deixadas “overnight” em estufa a 60°C para que o material do corte aderisse à lâmina. A recuperação antigênica foi feita no

equipamento PT-Link (Dako, Glostrup, Dinamarca) em solução de recuperação antigênica em pH 9.0 (“EnVision FLEX Target Retrieval Solution High pH (50x)”, Dako). O processo de recuperação antigênica foi realizado durante 20 minutos a 95°C. Após esta etapa e em todas as etapas subsequentes, as lâminas foram lavadas em tampão “EnVision FLEX Wash Buffer” (Dako), diluído 1:200 em água destilada, por 5 minutos. Os cortes foram demarcados com caneta hidrofóbica. Para todos os anticorpos a diluição utilizada foi determinada em testes em amostras prévias.

Para a investigação da expressão do gene *CADM1* foi realizado bloqueio por 20 minutos com 100 µL de peróxido de hidrogênio a 3% (Dako). Foram adicionados 100 µL do anticorpo *CADM1*, diluído 1:600 na solução “EnVision FLEX Antibody Diluent” (Dako), por 16 horas “overnight”. O anticorpo anti-*CADM1* é conjugado, policlonal isotipo Ig de coelho, que reage na região N-terminal da proteína *CADM1* (SynCAM humano) (ABBIOTEC, Le Plessis Robinson, França).

Para a investigação da expressão do gene *TWIST1* foi realizado bloqueio por 20 minutos com 100 µL de peróxido de hidrogênio a 3% (Dako). Foram adicionados 100 µL do anticorpo monoclonal, diluído 1:3000 na solução “EnVision FLEX Antibody Diluent” (Dako), por 16 horas “overnight”. O anticorpo anti-*TWIST1* é conjugado, monoclonal (clone 10E4E6, Genetex, Irvine, Estados Unidos da América) e reconhece a região entre os aminoácidos 9 e 74 da proteína *TWIST1* humano.

Para a investigação da expressão do gene *CDH1* (*E-caderina*) foi realizado bloqueio por 5 minutos com 100 µL de peróxido de hidrogênio a 3% (Dako). A seguir, foram adicionados 100 µL do anticorpo pronto para uso (Dako) e incubado durante 20 minutos. O anticorpo anti-*CDH1* é monoclonal derivado de camundongo (clone NCH-38, anti-humano) e reconhece os fragmentos de *E-caderina* de 120 kDa e de 82 kDa. Na sequência, foi adicionado o anticorpo secundário “EnVision FLEX Mouse LINKER” (Dako) e incubado por 15 minutos.

Após estas etapas, em todas as reações foram adicionados 100 µL de polímero “EnVision FLEX/HRP” (Dako), seguido de incubação durante 20 minutos. Na sequência, foram adicionados 100 µL da solução de cromógeno de diaminobenzidina (“EnVision FLEX – DAB Cromógeno”, Dako), com incubação durante 20 minutos. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Gill e

montadas com meio de montagem (Dako), sendo identificadas com etiquetas com código de barras.

4.5.2 Leitura e interpretação dos resultados

A expressão do *CADM1* e do *CDH1* (*E-caderina*) foi avaliada no citoplasma e na membrana celular. A expressão do *TWIST1* foi avaliada no núcleo celular. As lâminas de imuno-histoquímica foram analisadas de modo cego, por dois patologistas experientes, em relação aos dados clínicos e histológicos dos pacientes. O método de leitura, interpretação dos resultados e definição dos *scores* foi baseado em You et al. (2012). Foram analisadas a porcentagem de células positivas e a intensidade da coloração em cada amostra.

Para a definição da porcentagem de células positivas, utilizou-se uma escala de 0 a 4: 0 a 10% de células coradas classificou-se como 0; 11 a 25% como 1; 26 a 50% como 2; 51 a 75% como 3 e 76 a 100% como 4. A intensidade da coloração foi graduada em uma escala de 0 a 3: resultado negativo foi classificado como 0; fraco como 1; moderado como 2 e forte como 3. O *score* final foi obtido multiplicando-se o resultado da porcentagem de células coradas pelo resultado da intensidade da coloração. Na análise final, um *score* menor do que 3 foi considerado negativo e *scores* iguais ou superiores a 3 foram considerados positivos.

4.6 Análise estatística

A análise estatística para o cálculo da diferença dos resultados interobservadores foi realizada através do índice de Kappa utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

A avaliação da significância estatística para cada marcador, *TWIST1*, *CADM1* e *CDH1*, entre os grupos dos melanomas com menos de 1,0 mm de espessura, dos melanomas com mais de 1,0 mm de espessura e dos nevos compostos displásicos foi realizada através do teste Mann-Whitney com o *Social Science Statistics* (<http://www.socscistatistics.com>). Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4.7 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), conforme diretrizes estabelecidas na Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e complementares, sob o parecer número 1.282.268.

As amostras selecionadas foram utilizadas exclusivamente para os fins previstos na pesquisa. Após a realização do estudo, os blocos histológicos foram devolvidos ao biobanco CEDAP, onde permanecerão armazenados por no mínimo 20 anos a partir do cadastro inicial do paciente, possibilitando que novos estudos sejam realizados a medida que as técnicas analíticas evoluam e novos marcadores moleculares surjam. Após os 20 anos o descarte do material será realizado, se necessário, conforme as normas do biobanco CEDAP, que foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) por meio do parecer 016/2016.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, este capítulo será apresentado na forma de artigo científico, encaminhado para publicação no periódico “Pathology - Research and Practice” (editora Elsevier; ISSN: 0344-0338).

AValiação DA EXPRESSÃO DOS GENES *CADM1*, *TWIST1* E *CDH1* POR IMUNO-HISTOQUÍMICA EM LESÕES MELANOCÍTICAS

Resumo

Introdução: O melanoma maligno é uma doença agressiva e sua incidência está aumentando no mundo. A predisposição genética e a exposição a fatores ambientais, principalmente a luz solar, são fatores de risco. A distinção histopatológica entre nevos e melanomas pode ser difícil. Prevê-se que a avaliação da expressão imuno-histoquímica de alguns genes poderia contribuir para o diagnóstico diferencial de lesões histologicamente questionáveis. *Objetivo:* Investigar se a avaliação da expressão imuno-histoquímica dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* (*E-caderina*), que participam dos mecanismos de adesão celular e transição epitelial-mesenquimal, contribui para o diagnóstico diferencial das lesões melanocíticas de difícil diagnóstico. *Metodologia:* Estudo transversal retrospectivo baseado na avaliação da expressão imuno-histoquímica dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* por imuno-histoquímica em amostras de 30 nevos compostos displásicos, 30 melanomas com menos de 1,0 mm de espessura e 30 melanomas com mais de 1,0 mm de espessura, diagnosticados no período de 2013 a 2016, em Joinville/SC. Foi utilizado um score que avaliou a intensidade da coloração e a proporção de células coradas. *Resultados:* Em comparação aos nevos melanocíticos compostos displásicos, observou-se redução significativa da expressão dos genes *CADM1* e *CDH1* nos melanomas (abaixo e acima de 1,0 mm de espessura) e nos melanomas de mais de 1,0 mm de espessura, respectivamente. Também se verificou menor expressão dos genes *CADM1* e *CDH1* nos melanomas com mais de 1,0 mm de espessura em relação aos melanomas com menos 1,0 mm. O gene *TWIST1* não apresentou diferença significativa da expressão entre os grupos. *Conclusão:* Estes achados permitem concluir que a expressão imuno-histoquímica do *CADM1* tem potencial para contribuir como ferramenta auxiliar ao diagnóstico diferencial entre nevos melanocíticos compostos displásicos e melanomas.

Palavras chave: Imuno-histoquímica, *CADM1*, *TWIST1*, *CDH1*, melanoma, nevo displásico

EVALUATION OF EXPRESSION OF GENES *CADM1*, *TWIST1* AND *CDH1* BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN MELANOCYTIC LESIONS

Abstract

Introduction: Malignant melanoma is an aggressive disease and its incidence is increasing worldwide. Genetic predisposition and exposure to environmental factors, especially sunlight, are risk factors. Histopathologic distinction between nevi and melanoma can be difficult. It is anticipated that the evaluation of the immunohistochemical expression of some genes could contribute to the differential diagnosis of questionable histologically lesions. *Objective:* To investigate whether the evaluation of the immunohistochemical expression of genes *CADM1*, *TWIST1* and *CDH1* (*E-cadherin*), that take part in mechanisms of cell adhesion and epithelial-mesenchymal transition, contributes to the differential diagnosis of melanocytic lesions difficult to diagnose. *Methodology:* Retrospective cross-sectional study based on immunohistochemical expression evaluation of genes *CADM1*, *CDH1* and *TWIST1* in samples of 30 dysplastic compound nevus, 30 melanomas with less than 1.0 mm thick and melanomas with more than 1.0 mm thick, diagnosed between 2013 and 2016, in Joinville/SC. A score was used to evaluate color intensity and proportion of cells stained. *Results:* There was a significant reduction in the expression of the genes *CADM1* and *CDH1* in melanomas (below and above 1.0 mm thick) and in melanomas of more than 1.0 mm in thickness, respectively, compared to dysplastic melanocytic nevi. There was also lower expression of the genes *CADM1* and *CDH1* genes in melanomas greater than 1.0 mm thick compared to melanomas less than 1.0 mm. The gene *TWIST1* showed no significant difference in expression between groups. *Conclusion:* These findings allow us to conclude that the immunohistochemical expression of *CADM1* has the potential to contribute as an auxiliary tool to the differential diagnosis between dysplastic compound nevus and melanoma.

Key-words: immunohistochemistry, *CADM1*, *TWIST*, *CDH1*, cutaneous melanoma, dysplastic nevus.

Introdução

O melanoma maligno é uma das neoplasias mais agressivas nos seres humanos. O número estimado de mortes por melanoma é de 48.000 por ano, em todo o mundo [1], e vem sendo relatado um aumento na incidência nas populações caucasianas [2].

A determinação das causas para o desenvolvimento do melanoma é complexa, com fatores de genéticos e ambientais influenciando o risco individual [3]. A exposição ocupacional, o estilo nutricional e principalmente a exposição à luz solar são fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento do melanoma cutâneo. Mudanças significativas na expressão de microRNA em resposta à exposição ambiental têm sido relatadas [4].

A precisão do diagnóstico do melanoma é crítica para a contenção da malignidade [1]. O exame histopatológico é o "padrão ouro" para o diagnóstico de lesões melanocíticas. No entanto, a distinção histopatológica definitiva entre as lesões benignas e as malignas, em alguns casos, pode ser difícil. É descrita uma discordância interobservador relativa ao diagnóstico de nevos e melanomas variando de 2,3 a 25% das lesões [5].

Marcadores moleculares podem ser utilizados como ferramentas auxiliares ao diagnóstico das lesões melanocíticas [5]. Ferramentas citogenéticas, tais como *Comparative Genomic Hybridization* e *Fluorescence in situ Hybridization*, foram desenvolvidas para ajudar na classificação de lesões melanocíticas ambíguas. No entanto, estes métodos moleculares requerem equipamentos e patologistas qualificados, portanto, não são utilizados rotineiramente [6]. Ao contrário, a imunohistoquímica é utilizada na maioria dos centros de patologia. Porém, apesar de muitos marcadores terem sido estudados, apenas poucos deles parecem servir como ferramentas auxiliares para o diagnóstico diferencial de nevo e melanoma e, até o momento, nenhum deles é suficiente para distinguir inequivocamente uma lesão melanocítica [5].

É descrito que a perda da expressão imunohistoquímica do gene *CADM1*, que ocorre nos melanomas, poderia servir como um marcador de melanoma em lesões histologicamente questionáveis [7]. Os níveis de *CADM1* são inversamente relacionados aos níveis de *TWIST1*, que é responsável por regular genes envolvidos

na adesão celular [8]. O TWIST1 participa do processo de transição epitelial mesenquimal (EMT) [9], que é um processo em que células perdem as propriedades de adesão e adquirem critérios mesenquimais permitindo a invasão e migração [10]. Por sua vez, a perda da expressão da E-caderina tem sido relatada na progressão e metástase dos melanomas cutâneos [11].

O objetivo deste estudo foi avaliar se a análise em conjunto da expressão imuno-histoquímica dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* (*E-caderina*) pode contribuir para o diagnóstico diferencial de lesões melanocíticas.

Métodos

Tipo, local e período do estudo

Estudo transversal retrospectivo realizado no Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos (CEDAP), laboratório de anatomia patológica, localizado na cidade de Joinville em Santa Catarina, Brasil. O estudo foi realizado em amostras coletadas nos anos de 2013, 2014, 2015 e 2016. A reavaliação histológica e as análises imuno-histoquímicas foram realizadas no período de maio de 2016 a janeiro de 2017.

Amostras e critérios de inclusão e exclusão

Foram selecionadas amostras a partir dos diagnósticos registrados no banco de dados do CEDAP. Os pacientes eram provenientes da rede pública e privada e todos tinham indicação clínica para a realização do procedimento.

Inicialmente foram selecionadas 120 amostras consecutivas, todas com acordo diagnóstico de dois patologistas, sendo 40 amostras de melanomas com menos de 1,0 mm de espessura, 40 melanomas com mais de 1,0 mm de espessura e 40 nevos melanocíticos compostos displásicos, com atipias moderadas. Foram excluídas as amostras que não apresentavam material suficiente para as análises subsequentes e as amostras que na reavaliação histológica apresentaram critérios diagnósticos duvidosos, totalizando 18 exclusões (9 amostras de melanomas com menos de 1,0 mm de espessura, 4 de melanomas com mais de 1,0 mm de

espessura e 5 de nevos melanocíticos). Por fim, para fins do estudo foram incluídas as 30 amostras consecutivas com diagnósticos mais recentes de cada grupo

Dentre os melanomas com menos de 1,0 mm de espessura, a média de idade foi 51 ± 17 anos. Conforme a classificação histológica do Colégio Americano de Patologistas, 27 eram de disseminação superficial e 3 melanomas sem outra classificação. A média da espessura foi de $0,5 \text{ mm} \pm 0,3 \text{ mm}$. Dentre os melanomas com mais de 1,0 mm de espessura, a média de idade foi 60 ± 14 anos. Dez eram do tipo histológico de disseminação superficial, 14 do tipo nodular, 1 melanoma acral, 1 melanoma nevoide e 4 melanomas, sem outra classificação. A média da espessura foi de $3,9 \text{ mm} \pm 3,8 \text{ mm}$. Dentre os nevos melanocíticos compostos displásicos, com atipias moderadas, a média de idade foi 40 ± 13 anos e todos tinham a informação clínica ou de análise macroscópica de diâmetro maior que 5,0 mm.

Imuno-histoquímica

As amostras foram previamente fixadas em formalina a 10% e dispostas em blocos de parafina. Foram realizados cortes com espessura de 4 micrômetros e dispostos em lâminas silanizadas e deixadas “overnight” em estufa a 60°C para que o material do corte aderisse à lâmina. A recuperação antigênica foi feita no equipamento PT-Link (Dako, Glostrup, Dinamarca) em solução de recuperação antigênica em pH 9.0 (“EnVision FLEX Target Retrieval Solution High pH (50x)”, Dako). O processo de recuperação antigênica foi realizado durante 20 minutos a 95°C . Após esta etapa e em todas as etapas subsequentes, as lâminas foram lavadas em tampão “EnVision FLEX Wash Buffer” (Dako), diluído 1:200 em água destilada, por 5 minutos. Os cortes foram demarcados com caneta hidrofóbica. Para todos os anticorpos a diluição utilizada foi determinada em testes em amostras prévias.

Para a investigação da expressão do gene *CADM1* foi realizado bloqueio por 20 minutos com 100 μL de peróxido de hidrogênio a 3% (Dako). Foram adicionados 100 μL do anticorpo *CADM1*, diluído 1:600 na solução “EnVision FLEX Antibody Diluent” (Dako), por 16 horas “overnight”. O anticorpo anti-CADM1 é conjugado, policlonal isotipo Ig de coelho, que reage na região N-terminal da proteína CADM1 (SynCAM humano) (ABBIOTEC, Le Plessis Robinson, França).

Para a investigação da expressão do gene *TWIST1* foi realizado bloqueio por 20 minutos com 100 µL de peróxido de hidrogênio a 3% (Dako). Foram adicionados 100 µL do anticorpo monoclonal, diluído 1:3000 na solução “EnVision FLEX Antibody Diluent” (Dako), por 16 horas “overnight”. O anticorpo anti-TWIST1 é conjugado, monoclonal (clone 10E4E6, Genetex, Irvine, Estados Unidos da América) e reconhece a região entre os aminoácidos 9 e 74 da proteína TWIST1 humano.

Para a investigação da expressão do gene *CDH1* (*E-caderina*) foi realizado bloqueio por 5 minutos com 100 µL de peróxido de hidrogênio a 3% (Dako). A seguir, foram adicionados 100 µL do anticorpo pronto para uso (Dako) e incubado durante 20 minutos. O anticorpo anti-CDH1 é monoclonal derivado de camundongo (clone NCH-38, anti-humano) e reconhece os fragmentos de E-caderina de 120 KDa e de 82 kDa. Na sequência, foi adicionado o anticorpo secundário “EnVision FLEX Mouse LINKER” (Dako) e incubado por 15 minutos.

Após estas etapas, em todas as reações foram adicionados 100 µL de polímero “EnVision FLEX/HRP” (Dako), seguido de incubação durante 20 minutos. Na sequência, foram adicionados 100 µL da solução de cromógeno de diaminobenzidina (“EnVision FLEX – DAB Cromógeno”, Dako), com incubação durante 20 minutos. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Gill e montadas com meio de montagem (Dako), sendo identificadas com etiquetas com código de barras.

Definição dos scores referentes aos resultados da imuno-histoquímica

A expressão do *CADM1* e do *CDH1* (*E-caderina*) foi avaliada no citoplasma e na membrana celular. A expressão do *TWIST1* foi avaliada no núcleo celular. As lâminas de imuno-histoquímica foram analisadas de modo cego, por dois patologistas experientes, em relação aos dados clínicos e histológicos dos pacientes. O score utilizado, o método de leitura e interpretação dos resultados foi baseado em You et al. (2012). Foram analisadas a porcentagem de células positivas e a intensidade da coloração em cada amostra.

Para a definição da porcentagem de células positivas, estabeleceu-se uma escala de 0 a 4: 0 a 10% de células coradas classificou-se como 0; 11 a 25% como 1; 26 a 50% como 2; 51 a 75% como 3 e 76 a 100% como 4. A intensidade da

coloração foi graduada em uma escala de 0 a 3: resultado negativo foi classificado como 0; fraco como 1; moderado como 2 e forte como 3. O score final foi obtido multiplicando-se o resultado da porcentagem de células coradas pelo resultado da intensidade da coloração. Na análise final, um score menor do que 3 foi considerado negativo e scores iguais ou superiores a 3 foram considerados positivos.

Análise estatística

A análise estatística para o cálculo da diferença dos resultados interobservadores foi realizada através do índice de Kappa utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*.

A avaliação da significância estatística para cada marcador, *TWIST1*, *CADM1* e *CDH1*, entre os grupos dos melanomas com menos de 1,0 mm de espessura, dos melanomas com mais de 1,0 mm de espessura e dos nevos compostos displásicos foi realizada através do teste Mann-Whitney com o *Social Science Statistics* (<http://www.socscistatistics.com>). Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Aspectos éticos

O estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), conforme diretrizes estabelecidas na Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e complementares, sob o parecer número 1.282.268.

As amostras selecionadas foram utilizadas exclusivamente para os fins previstos na pesquisa. Após a realização do estudo, os blocos histológicos foram devolvidos ao biobanco CEDAP, onde permanecerão armazenados por no mínimo 20 anos a partir do cadastro inicial do paciente, possibilitando que novos estudos sejam realizados a medida que as técnicas analíticas evoluam e novos marcadores moleculares surjam. Após os 20 anos o descarte do material será realizado, se necessário, conforme as normas do biobanco CEDAP.

Resultados

A expressão imuno-histoquímica dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* foi avaliada em melanomas com menos de 1,0 mm de espessura, com mais de 1,0 mm de espessura e em nevos melanocíticos compostos displásicos, com atipias moderadas. O *CADM1* mostrou expressão predominantemente citoplasmática, o *TWIST1* mostrou expressão predominantemente nuclear e o *CDH1* mostrou expressão de membrana e citoplasma (Figura 1).

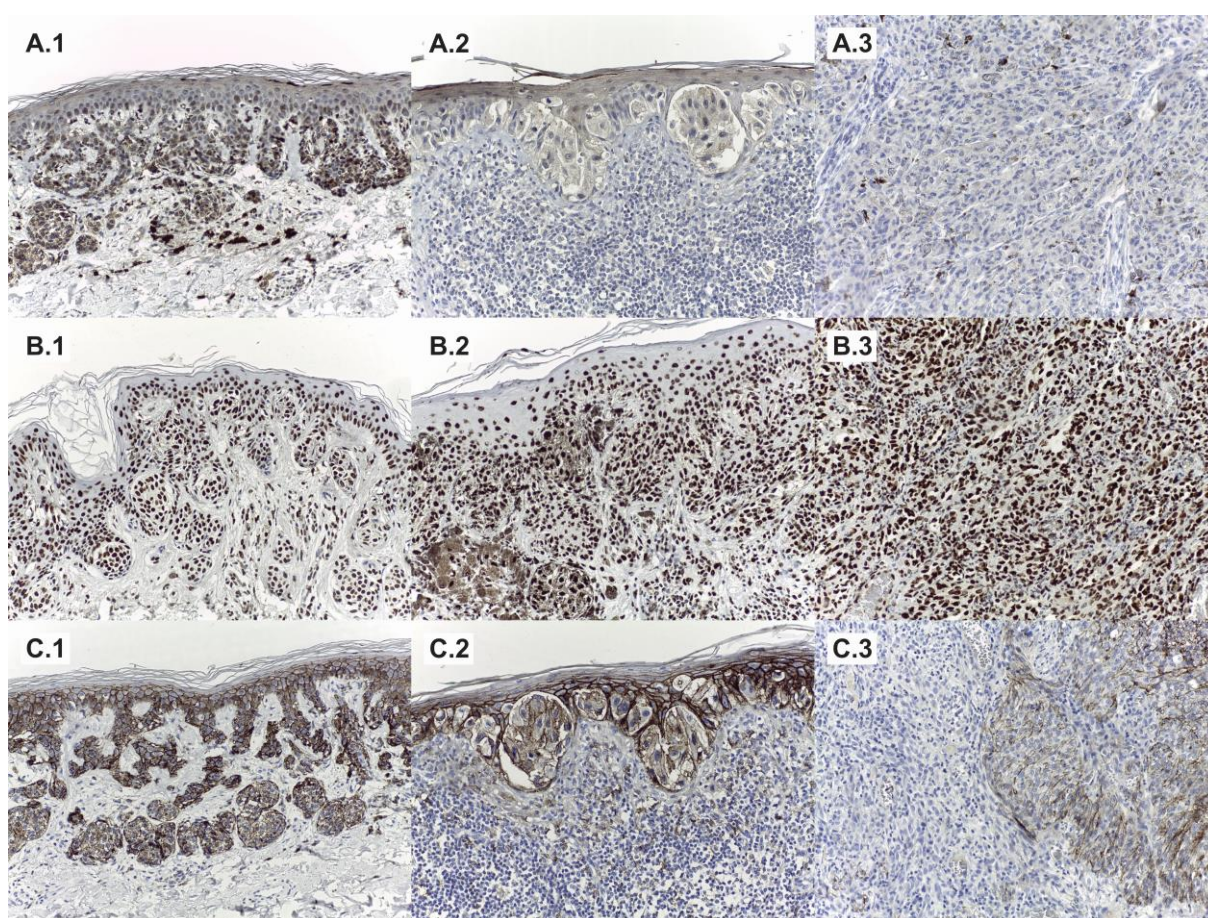


Figura 1: Expressão imuno-histoquímica de *CADM1* (A), *TWIST1* (B) e *CDH1* (C) em nevo composto displásico (1), em melanomas com menos de 1,0 mm de espessura (2) e mais de 1,0 mm de espessura (3). Aumento de 200x.

A Figura 2 apresenta os scores médios referentes à avaliação imuno-histoquímica da expressão dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* nos grupos de nevos melanocíticos compostos displásicos, melanomas com menos de 1,0 mm de espessura e melanomas com mais de 1,0 mm de espessura.

O índice de Kappa para os grupos melanomas com menos de 1,0 mm de espessura, melanomas com mais de 1,0 mm de espessura e nevos melanocíticos compostos displásicos foi de, respectivamente, 0,09, 0,05 e 0,29 para o gene *CADM1*, 1,00, 0,37 e 0,17 para o gene *TWIST1* e 0,45, 0,31 e 0,24 para o gene *CDH1*.

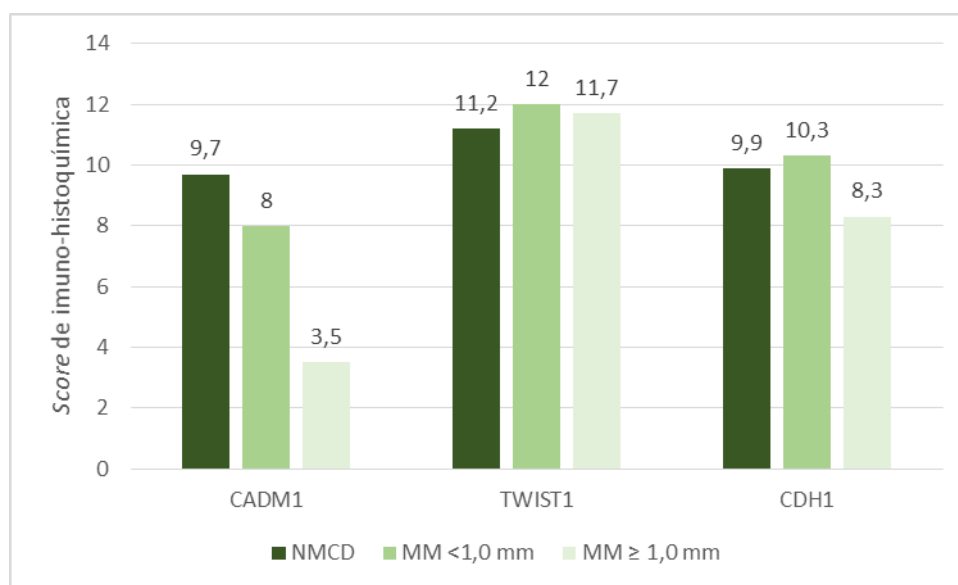


Figura 2 Scores médios referentes à expressão imuno-histoquímica dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* nos grupos de nevos melanocíticos compostos displásicos (NMCD), melanomas (MM) com menos de 1,0 mm de espessura e melanomas com mais de 1,0 mm de espessura.

Em comparação aos nevos melanocíticos compostos displásicos, observou-se redução da expressão dos genes *CADM1* e *CDH1* nos melanomas [abaixo ($p = 0,003$) e acima ($p = <0,05$) de 1,0 mm de espessura] e em melanomas de mais de 1,0 mm de espessura ($p = 0,023$), respectivamente. Também verificou-se menor expressão dos genes *CADM1* e *CDH1* nos melanomas com mais de 1,0 mm de espessura em relação aos melanomas com menos 1,0 mm de espessura ($p = <0,05$ e $p = 0,008$, respectivamente). O gene *TWIST1* não apresentou diferença significativa da expressão entre os grupos ($p < 0,05$).

A sensibilidade para os genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* foi respectivamente de 31%, 100%, 11%. A especificidade para os genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* foi respectivamente de 100%, 0%, 93%.

Discussão

Nossos resultados demonstraram menor expressão imuno-histoquímica do gene *CADM1* nos melanomas em relação aos nevos melanocíticos compostos displásicos, assim como nos melanomas com mais de 1,0 mm de espessura comparativamente aos com menos de 1,0 mm.

A perda da expressão imuno-histoquímica do *CADM1* tem sido demonstrada nos melanomas [12]. YOU et al [13], em 2010, avaliaram a expressão imuno-histoquímica do *CADM1* em 120 melanomas, dentre os quais 84 (70%) foram classificados como negativos e os positivos foram significativamente associados ao estágio histológico do melanoma. Em 2012, YOU et al [7] encontraram diferença significativa na expressão imuno-histoquímica do *CADM1* em lesões melanocíticas de 50 pacientes na Harbin Medical University, China, sendo esta em média 3,6 vezes inferior nos melanomas quando comparados aos nevos displásicos, o que foi corroborado pela equivalente redução de 2,7 vezes observada em melanomas com mais de 1,0 mm de espessura no presente estudo. Outro estudo, também realizado na Harbin Medical University, China, observou que a perda da expressão do *CADM1* em cultura celular pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) está associada à metástase e progressão da lesão [14].

Em relação ao gene *TWIST1*, nosso estudo apresentou resultados que diferem dos encontrados na literatura. Não houve diferença significativa da expressão do gene entre os grupos.

Um estudo realizado por Hoek et al. [15], que avaliou a expressão do *TWIST1* em 553 melanomas pela técnica *Melanoma Tissue Microarrays*, indicou que a superexpressão do *TWIST1* está associada ao pior prognóstico. Encontrou ainda que a coloração intensa foi mais evidente nos melanomas metastáticos do que nos melanomas primários. Dentre as lesões primárias, não houve diferença significativa entre os níveis de Breslow. Outro estudo, realizado por Papadogeorgakis [16] em amostras de pacientes de Hospitais Universitários de Leicester, na Inglaterra, entre os anos de 1996 e 2006, encontrou que, pelo método de imuno-histoquímica, o *TWIST1* foi negativo no melanócitos normais e na maioria dos nevos e a coloração nuclear forte estava presente na maioria dos melanomas. Por sua vez, Ansieau et al., em 2008, estudaram a expressão do *TWIST1* por imuno-histoquímica em 12

nevus e em 10 melanomas de pacientes do Centre Léon Bérard, na França, e não encontraram nenhuma expressão do *TWIST1* nos nevus em contraste com os níveis altos de *TWIST1* encontrados em 5 de 10 melanomas [17].

Em nosso estudo, o gene *CDH1* (*E-caderina*) mostrou redução da expressão imuno-histoquímica nos melanomas com mais de 1,0 mm de espessura em relação aos melanomas com menos de 1,0 mm e aos nevus melanocíticos compostos displásicos.

O desenvolvimento do melanoma é usualmente associado ao decréscimo da concentração de *CDH1* e é sugerido que existem múltiplas vias de sua inibição [18]. A perda da expressão do gene *CDH1* tem sido relatada nas metástases dos melanomas cutâneos [11]. Caramel et al. [19] encontraram, pela técnica de PCR, a partir de cultura celular, que a ativação dos fatores de transcrição da transição epitelial mesenquimal nos melanomas tardios, dentre eles o *TWIST1*, está associada ao aumento dos níveis de fosfo-ERK. Este mecanismo resulta na perda da *CDH1*, aumento da invasão e constitui um fator independente de pior prognóstico nos pacientes com melanomas. Jung et al. [20] realizaram a comparação da expressão imuno-histoquímica do gene *CDH1* em melanomas com mais de 1,0 mm de espessura e em melanomas com menos de 1,0 mm de espessura, tendo constatado maior positividade em melanomas finos.

Uma limitação neste estudo refere-se a um baixo índice de concordância entre observadores na leitura dos resultados relativos ao *CADM1*. Uma das causas possíveis pode ter sido a presença do pigmento citoplasmático de melanina interferindo na análise microscópica, uma vez que a expressão deste gene também tem localização citoplasmática. Na avaliação do *TWIST1*, por sua vez, identificou-se que o clone 10E4E6 utilizado neste estudo diferiu do clone “2C1a” (Biomatrix e Abcam) citado na literatura [16, 17], o que pode ter contribuído para as discordâncias entre os resultados.

Conclui-se que a expressão imuno-histoquímica do *CADM1* apresenta potencial para servir como marcador para o diagnóstico diferencial entre nevus melanocíticos compostos displásicos e melanomas. No entanto, outros estudos devem ser realizados para avaliar a expressão dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1*, incluindo outras técnicas e marcadores, utilizando métodos padronizados, com

objetivo de aumentar a especificidade dos testes para o diagnóstico diferencial de lesões melanocíticas.

Colaboradores

K.M.P.A.Coelho foi responsável pelo planejamento do estudo, coleta e construção do banco de dados, análise e interpretação de resultados e redação do manuscrito.

P.H.C. França foi responsável pelo planejamento do estudo, construção do banco de dados, análise e interpretação dos resultados e revisão crítica do manuscrito.

H. Fronza Jr. contribuiu para o planejamento do estudo e revisão crítica do manuscrito.

R. Blasius foi responsável pela técnica de imuno-histoquímica e interpretação dos resultados.

J. Stall contribuiu para o planejamento do estudo e revisão crítica do manuscrito.

Financiamento

O estudo foi realizado com recursos do Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos e da bolsa CAPES.

Conflito de interesses

Todos os autores declaram ausência de conflito de interesses em relação ao estudo.

Referências

[1] G. Zhang, G. Li, Novel Multiple Markers to Distinguish Melanoma from Dysplastic Nevi, PLoS One. (7) (9) (2012) 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0045037.

[2] G. Kiszner, et al., Cell cycle analysis can differentiate thin melanomas from dysplastic nevi and reveals accelerated replication in thick melanomas, Virchows Arch. (464) (5) (2014) 603–612. doi:10.1007/s00428-014-1570-1.

- [3] S.C. Azoury, J.R. Lange, *Epidemiology, Risk Factors, Prevention, and Early Detection of Melanoma*, *Surg Clin N Am.* (94) (5) (2014) 945-962. doi: 10.1016/j.suc.2014.07.013.
- [4] B.C. Melnik, *MiR-21: an environmental driver of malignant melanoma?*, *J. Transl. Med.* (13) (2015) 202. doi:10.1186/s12967-015-0570-5.
- [5] A. Uguen, et al., *A p16-Ki-67-HMB45 immunohistochemistry scoring system as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma.*, *Diagn. Pathol.* (10) (1) (2015) 195. doi:10.1186/s13000-015-0431-9.
- [6] M. Kashani-Sabet, et al., *A multi-marker assay to distinguish malignant melanomas from benign nevi.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (105) (15) (2009) 6268–6272. doi:10.1073/pnas.0901185106.
- [7] Y. You, S.H. Wang, J.F. Zhang, S.Y. Zheng, *TSLC1 expression discriminates cutaneous melanomas from dysplastic nevi*, *Melanoma Res.* (22) (6) (2012) 430–435. doi:10.1097/CMR.0b013e328358d9a2.
- [8] E.J. Hartsough, M.B. Weiss, C.H. Kugel, S.R. Rosenbaum, A.E. Aplin, *CADM1 is a TWIST1 regulated supressor of melanoma invasion [abstract]*, *Cancer Res* (75) (15 Suppl) (2015) Abstract nr 4089. doi:10.1158/1538-7445.AM2015-4089.
- [9] M.A. Khan, H.C. Chen, D. Zhang, J. Fu, *Twist: a molecular target in cancer therapeutics*, *Tumour Biol*, (34) (5) (2013) 2497-506. doi: 10.1007/s13277-013-1002-x.
- [10] B. Beck, et al., *Different levels of Twist1 regulate skin tumor initiation, stemness, and progression*, *Cell Stem Cell.* (16) (1) (2015) 67–79. doi:10.1016/j.stem.2014.12.002.
- [11] B. Anna, Z. Blazej, G. Jacqueline, C.J. Andrew, R. Jeffrey, S. Andrzej, *Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma.*, *Expert Rev Dermatol.* (2) (4) (2007) 451–469. doi:10.1016/j.bbi.2008.05.010.
- [12] E.B. Rees, *Microrna-205 Involvement in Cutaneous Melanoma*, Queen's University Kingston, 2012.
- [13] Y. You, L. Ma, M. You, X. Li, S. Wang, H. Li, D. Wu, H. Yang, Z.Y. Li, *TSLC1 gene silencing in cutaneous melanoma.*, *Melanoma Res.* (20) (3) (2010) 179–183. doi:10.1097/CMR.0b013e32833413c0.
- [14] Y. You, J. Zhang, Y. Li, Y. Li, G. Shi, L. Ma, H. Wei, *CADM1/TSLC1 inhibits melanoma cell line A375 invasion through the suppression of matrix*

metalloproteinases, *Mol. Med. Rep.* (10) (5) (2014) 2621–2626. doi:10.3892/mmr.2014.2556.

[15] K. Hoek, et al., Expression Profiling Reveals Novel Pathways in the Transformation of Melanocytes to Melanomas Expression Profiling Reveals Novel Pathways in the Transformation of Melanocytes to Melanomas, *Cancer Res.* (64) (15) (2004) 5270–5282. doi:10.1158/0008-5472.can-04-0731.

[16] E. Papadogeorgakis, Development of malignant melanoma is dependent on a switch in Embryonic Transcription Factors orchestrated by the BRAF-MAPK pathway, University of Leicester, 2013.

[17] S. Ansieau, et al., Induction of EMT by Twist Proteins as a Collateral Effect of Tumor-Promoting Inactivation of Premature Senescence, *Cancer Cell.* (14) (1) (2008) 79–89. doi:10.1016/j.ccr.2008.06.005.

[18] K.S.M. Smalley, Mutant BRAF: a novel mediator of microenvironmental escape in melanoma?, *J. Invest. Dermatol.* (133) (5) (2013) 1135–7. doi:10.1038/jid.2012.474.

[19] J. Caramel et al., A switch in the expression of embryonic emt-inducers drives the development of malignant melanoma, *Cancer cell.* (24) (4) (2013) 466–480. doi: 10.1016/j.ccr.2013.08.018.

[20] J.E. Jung, et al, Immunohistochemical assessment of E-cadherin, β -catenin, CEACAM-1 and PTEN: tumor progression markers in melanoma, *J Bras Patol Med Lab.* (46) (2) (2010) 111-118. Doi: 10.1590/S1676-24442010000200007.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo foi avaliada a expressão imuno-histoquímica dos genes *CADM1*, *TWIST1* e *CDH1* (*E-caderina*) em nevos melanocíticos compostos displásicos e melanomas. Nossas principais conclusões obtidas foram:

- A expressão imuno-histoquímica do gene *CADM1* nas lesões melanocíticas tem potencial para contribuir para o diagnóstico diferencial entre nevos melanocíticos compostos displásicos e melanomas, e entre melanomas com menos de 1,0 mm e mais de 1,0 mm de espessura;
- A avaliação da expressão imuno-histoquímica do gene *TWIST1* nas lesões melanocíticas, com emprego do anti-TWIST correspondente ao clone 10E4E6, não contribui para o diagnóstico diferencial entre nevos melanocíticos compostos displásicos e melanomas;
- A expressão imuno-histoquímica do gene *CDH1* nas lesões melanocíticas tem potencial para contribuir para o diagnóstico diferencial de nevos melanocíticos compostos displásicos e melanomas com mais de 1,0 mm de espessura.

REFERÊNCIAS

AMERICAN Cancer Society. **Key Statistics for Melanoma Skin Cancer**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html>>. Acesso em: 05/11/2016.

ANNA, B. et al. **Mechanism of uv-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma**. Expert review of dermatology. v. 2, n. 4, p. 451–469. 2007.

BASTIAN, B. C. **The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia**. Annu Rev Pathol, [S.l.]: [s.n.]. v. 9. 2014.

BECK, B. et al. **Different levels of twist1 regulate skin tumor initiation, stemness, and progression**. Cell stem cell. v. 16, n. 1, p. 67–79. 2015.

BENNETT, D. C. **How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events?** Pigment Cell Melanoma Res. v. 21, n. 1, p. 27–38. 2008.

BOURNE, P.; ROSENDAHL, C.; KEIR, j.; CAMERON, A. **BLINCK - A diagnostic algorithm for skin cancer diagnosis combining clinical features with dermatoscopy findings**. Dermatol Pract Concept. v. 2, n. 2, p. 0202a12. 2012.

BRESSAC-DE-PAILLERETS, B. et al. **Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma**. Biochimie. v. 84, n. 1, p. 67–74. 2002.

BUSAM, K. J. **Molecular pathology of melanocytic tumors**. Seminars in diagnostic pathology. v. 30, n. 4, p. 362–374. 2013.

CARAMEL, J. et al. **A switch in the expression of embryonic emt-inducers drives the development of malignant melanoma**. Cancer cell. v. 24, n. 4, p. 466–480. 2013.

CLARK, W. H. Jr.; REIMER, R. R.; GREENE. M.; AINSWORTH, A. M.; MASTRANGELO, M. J. **Origin of familial malignant melanomas from heritable**

melanocytic lesions. 'The B-K mole syndrome'. Arch Dermatol. V. 114, n. 1, p. 732-738. 1978.

COSTA, N. F. DA; FERNANDES, N. C.; BORGES, M. R. M. M. Study of the histopathological types of cutaneous melanoma in Palmas-to from 2001 to 2011. An Bras Dermatol. v. 90, n. 5, p. 638–645. 2015.

DUFFY, K.; GROSSMAN, D. The dysplastic nevus: from historical perspective to management in the modern era: part i. historical, histologic, and clinical aspects. J Am Acad Dermatol. v. 67, n. 1, p. 1–27. 2012.

DUFFY, K.; GROSSMAN, D. The dysplastic nevus: from historical perspective to management in the modern era: part ii. molecular aspects and clinical management. J Am Acad Dermatol. v. 67, n. 1, p. 1–22. 2012.

DUNCAN, L. M. The classification of cutaneous melanoma. Hematol Oncol Clin North Am. v. 23, n. 3, p. 501–513. 2009.

FERNANDES, M. Análise da expressão protéica de moléculas de adesão celular em melanomas cutâneos. 2011. 43 f. Monografia (Bacharel em Ciências Biomédicas) – Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Botucatu.

FARAJI, F. et al. Cadm1 is a metastasis susceptibility gene that suppresses metastasis by modifying tumor interaction with the cell-mediated immunity. PloS Genet. v. 8, n. 9, p. e1002926. 2012.

FIGUEIREDO, L. C. et al. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. Rev Bras Cancerol. v. 49, n. 3, p. 179–183. 2003.

FRISHBERG, D. P. et al. Protocol for the examination of specimens from patients with melanoma of the skin. Arch Pathol Lab Med. v. 133, n. 10, p. 1560-1567. 2009.

GARBE, C. et al. Diagnosis and treatment of melanoma. european consensus-based interdisciplinary guideline - update 2012. Eur J Cancer. v. 48, n. 15, p. 2375–2390. 2012.

GOLDSTEIN, A. M.; TUCKER, M. A. **Dysplastic nevi and melanoma**. *Cancer epidemiol biomarkers prev.* v. 22, n. 4, p. 528–532. 2013.

GRANT-KELS, J. M. **Color Atlas of Dermatopathology**. New York: CRC Press, 2007.

GREENE, F. L.; TROTTI, A. **AJCC/UICC AJCC Cancer Staging Manual**. 7th ed. New York: Springer; 2010.

HARTSOUGH, E. J.; WEISS, M. B.; KUGEL, C. H.; ROSENBAUM, S. R.; APLIN, A. E. **CADM1 is a TWIST1 regulated supressor of melanoma invasion**. *Cancer Res.* v. 75, n. 15 Suppl, abstract n. 4089. 2015.

HAWRYLUK, E. B.; FISHER, D. E. **Melanoma epidemiology, risk factors, and clinical phenotypes**. *Advances in Malignant Melanoma - Clinical and Research Perspectives*. 2011.

HUGO Gene Nomenclature Committe. **Symbol report: CDH1**. Disponível em: <http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=HGNC:1748>. Acesso em: 15/01/2017.

HUSSEIN, M. R. A.; WOOD, G. S. **Molecular aspects of melanocytic dysplastic nevi**. *J Mol Diagn.* v. 4, n. 2, p. 71–80. 2002.

JHAPPAN, C.; NOONAN, F. P.; MERLINO, G. **Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma**. *Oncogene*.v. 22, n. 20, p. 3099-3112. 2003.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. **Review series the basics of epithelial-mesenchymal transition**. *J Clin Invest.* v. 119, n. 6, p. 1420–1428. 2009.

KASHANI-SABET, M. et al. **A multi-marker assay to distinguish malignant melanomas from benign nevi**. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 106, n. 15, p. 6268–72. 2009.

KHAN, M. A.; CHEN, H. C.; ZHANG, D.; FU, J. **Twist: a molecular target in cancer therapeutics**. *Tumour Biol.* v. 34, n.5, p. 2497-506. 2013.

KISZNER, G. et al. **Cell cycle analysis can differentiate thin melanomas from dysplastic nevi and reveals accelerated replication in thick melanomas.** Virchows Archiv. v. 464, n. 5, p. 603–612. 2014.

LAGA, A. C.; MURPHY, G. F. **Cellular heterogeneity in vertical growth phase melanoma.** Arch Pathol Lab Med. v. 134, n. 12, p. 1750–1757. 2010.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. **Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition.** Nat Rev Mol Cell Biol. v. 15, n. 3, p. 178–196. 2014.

LIANG, Q.; CHEN, G.; LI, Z.; WANG, B. **Function and histopathology of a cell adhesion molecule TSLC1 in cancer.** Cancer Invest. v. 29, n. 2, p. 107–12. 2011.

MACKEE, P. H. **McKee's Pathology of the Skin.** 4th ed. Elsevier, 2012.

MAESTRO, R. et al. **Twist Is a Potential Oncogene That Inhibits Apoptosis.** Genes Dev. v. 13, n. 17, p. 2207–2217. 1999.

MAGANA G., M. **El nevo de Clark (displásico) en México.** Gac Med Mex. v. 130, n. 17, p. 361-367. 1994.

MCCOURT, C.; DOLAN, O.; GORMLEY, G. **Malignant melanoma: a pictorial review.** Ulster Med J. v. 83, n. 2, p. 103–110. 2014.

MCGARY, E. C.; LEV, D. C.; BAR-ELI, M. **Cellular Adhesion Pathways and Metastatic Potential of Human Melanoma.** Cancer Biol Ther. v. 1, n. 5, p. 454–459. 2002.

MELNIK, B. C. **MiR-21: an environmental driver of malignant melanoma?** J Transl Med. v. 13, p. 202. 2015.

MENON, D. R. et al. **TGF- β 1 and TNF- α differentially regulate Twist1 mediated resistance towards BRAF/MEK inhibition in melanoma.** Pigment Cell Melanoma Res. v. 26, n. 6, p. 912–916. 2013.

INSTITUTO Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>. Acesso em: 05/11/2016.

MOMOSE, K. et al. **miR-214 and hypoxia down-regulate Necl-2/CADM1 and enhance ErbB2/ErbB3 signaling**. *Genes to Cells*. v. 18, n. 3, p. 195–202. 2013.

MOZURAITIENE, J.; BELSKIENE, K.; ATKOCIUS, V.; LABEIKYTE, D. **Molecular alterations in signal pathways of melanoma and new personalized treatment strategies: targeting of notch**. *Medicina (Lithuania)*. v. 51, n. 3, p. 133–145. 2015.

MURAKAMI, Y. **Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis**. *Cancer Sci*. v. 96, n. 9, p. 543–552. 2005.

NA, Y. R.; LEE, J. S.; SEOK, S. H. **Interleukin-6-induced Twist and N-cadherin enhance melanoma cell metastasis**. *Melanoma Res*. V. 23, n. 6, p. 434-43. 2013.

NATIONAL Center for Biotechnology Information. **CADM1 cell adhesion molecule 1 [Homo sapiens (human)]**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23705>>. Acesso em: 15/01/2017.

NATIONAL Center for Biotechnology Information. **CDH1 cadherin 1 [Homo sapiens (human)]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/999>>. Acesso em: 15/01/2017.

NATIONAL Cancer Center Research Institute Japan. **Overview of Research Activities**. Disponível em: <http://www.nccri.ncc.go.jp/en/annrep/2005/3_overview.html>. Acesso em: 15/01/2017.

ONLINE Mendelian Inheritance in Man. **TWIST, Drosophila, homolog of, 1; TWIST1**. Disponível em: <<http://omim.org/entry/601622>>. Acesso em: 15/01/2017.

PALIT, A.; INAMADAR, A. C. **Immunohistochemistry: relevance in dermatology**. *Indian J Dermatol*. v. 56, n. 6, p. 629–640. 2011.

PALMIERI, G. et al. **Main roads to melanoma**. *J Transl Med.* v.14, n. 7, p. 86. 2009.

PAPADOGEORGAKIS, E. **Development of malignant melanoma is dependent on a switch in Embryonic Transcription Factors orchestrated by the BRAF-MAPK pathway**. Department of Cancer Studies and Molecular Medicine. Thesis (degree of Doctor of Philosophy) - University of Leicester; 2013.

PRIETO, V. G.; SHEA, C. R. **Immunohistochemistry of melanocytic proliferations**. *Arch Pathol Lab Med.* v. 135, n. 7, p. 853–859. 2011.

PSATY, E. L.; SCOPE, A.; HALPERN, A. C.; MARGHOOB, A. A. et al. **Defining the patient at high risk for melanoma**. *Int J Dermatol.* v. 49, n. 4, p. 362–376. 2010.

QIANG, L. et al. **Regulation of cell proliferation and migration by p62 through stabilization of Twist1**. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 111, n. 25, p. 9241–9246. 2014.

REES, E. B. **Microrna-205 involvement in cutaneous melanoma**. Thesis (degree of Master of Science) - Queen's University Kingston; 2012.

REZZE, G. G.; LEON, A.; DUPRAT, J. **Nevo displásico (nevo atípico)**. *An Bras Dermatol.* v. 85, n. 6, p. 863–871. 2010.

SHIRAZI, N.; JINDAL, R.; SINGH, S.; HARSH, M.; AHMAD, S. **Pigmented pre-malignant and malignant lesions of skin with special reference to atypical presentations**. *J Clin Diagn Res.* v. 9, n. 7, p. 10–12. 2015.

SILVA, J. H.; DE SÁ, B. C. S.; ÁVILA, A. L. R.; LANDMAN, G.; DUPRAT NETO, J. P. **Atypical mole syndrome and dysplastic nevi: identification of populations at risk for developing melanoma - review article**. *Clinics (São Paulo, Brazil).* v. 66, n. 3, p. 493–9. 2011.

SINGH, S.; GRAMOLINI, A. O. **Characterization of sequences in human TWIST required for nuclear localization**. *BMC cell biology.* v. 10, p. 47. 2009.

STEGLISH, R. B. **Aspectos Epidemiológicos e histopatológicos do melanoma cutâneo primário em residentes de Joinville – SC, 2003-2014.** 2015. 135 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) – Universidade da Região de Joinville, Joinville.

TSAO, H.; CHIN, L.; GARRAWAY, L. A.; FISHER, D. E. **Melanoma: from mutations to medicine.** Genes Dev. v. 26, n. 11, p. 1131–1155. 2012.

TULCHINSKY, E.; PRINGLE, H.; CAMEL, J.; ANSIEAU, S. **Plasticity of melanoma and EMT-TF reprogramming.** Oncotarget. v. 5, n. 1, p. 1–2. 2013.

UGUEN, A. et al. **A p16-Ki-67-HMB45 immunohistochemistry scoring system as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma.** Diagn Pathol. v. 10, n. 1, p. 195. 2015.

VAN DER WEYDEN, L.; ARENDS, M. J.; RUST, A. G.; POULOGIANNIS, G.; MCLNTYRE, R. E.; ADAMS, D. J. **Increased tumorigenesis associated with loss of the tumor suppressor gene Cadm1.** Mol Cancer. v. 11, n. 1, p. 29. 2012.

VOLKOVOVA, K.; BILANICOVA, D.; BARTONOVA, A.; LETASIOVA, S.; DUSINSKA, M. **Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Review.** Environ health. v. 11 Suppl 1, p. S12. 2012.

WANG, Y.; ZHOU, B. P. **Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis.** Chin J Cancer. v. 30, n.9, p. 603-11. 2011.

WEEDON, D. **Skin Pathology.** 3th ed. Elsevier, 2010.

WEISS, M. B.; ABEL, E. V.; MAYBERRY, M. M.; BASILE, K. J.; BERGER, A. C.; APLIN, A. E. **TWIST1 is an ERK1/2 effector that promotes invasion and regulates MMP-1 expression in human melanoma cells.** Cancer Res. v. 72, n. 24, p. 6382–6392. 2012.

WEISS, M. B.; ABEL, E. V.; DADPEY, N.; APLIN, A. E. **FOXD3 Modulates Migration Through Direct Transcriptional Repression of TWIST1 in melanoma.** Mol Cancer Res. v.12, n. 9, p. 1314–1323. 2014.

WICK, M. R.; PATTERSON, J. W. **Cutaneous melanocytic lesions: selected problem areas**. American journal of clinical pathology. v. 124 Suppl 1. [s. p.]. 2005.

WOODHEAD, A. D.; SETLOW, B.; TANAKA, M. **Environmental Factors in Nonmelanoma and Melanoma Skin Cancer**. J Epidemiology. v. 9, n. 6 Suppl 1, p. S102-S114. 1999.

YAJIMA, I. et al. **RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT signaling in malignant melanoma progression and therapy**. Dermatol Res Pract. v. 2012, n. 1, p. 10–15. 2012.

YOU, Y. et al. **CADM1/TSLC1 inhibits melanoma cell line A375 invasion through the suppression of matrix metalloproteinases**. Mol Med Rep. v. 10, n. 5, p. 2621–2626. 2014.

YOU, Y.; S. H.; ZHANG, J. F.; ZHENG, S. Y. **TSLC1 expression discriminates cutaneous melanomas from dysplastic nevi**. Melanoma Res. v. 22, n. 6, p. 430–435. 2012.

YOU, Y. et al. **TSLC1 gene silencing in cutaneous melanoma**. Melanoma res. v. 20, n. 3, p. 179–183. 2010.

ZHANG, G.; LI, G. **Novel Multiple Markers to Distinguish Melanoma from Dysplastic Nevi**. PLoS One. v. 7, n. 9, p. 1-9. 2012.

ZEMBOWICZ, A.; PRIETO, V. G. **Melanocytic lesions: current state of knowledge**. Arch Pathol Lab Med. v. 135, n. 7, p. 824. 2010.

ZEMBOWICZ, A.; SCOLYER, R. A. **Nevus/melanocytoma/melanoma: an emerging paradigm for classification of melanocytic neoplasms?** Arch Pathol Lab Med. v. 135, n. 3, p. 300–306. 2011.