

KARINA MUNHOZ DE PAULA ALVES COELHO

**AVALIAÇÃO DA PIGMENTAÇÃO POR MELANINA E DA EXPRESSÃO DE STAT6
E MITF EM MELANOMAS CUTÂNEOS**

JOINVILLE

2022

KARINA MUNHOZ DE PAULA ALVES COELHO

**AVALIAÇÃO DA PIGMENTAÇÃO POR MELANINA E DA EXPRESSÃO DE STAT6
E MITF EM MELANOMAS CUTÂNEOS**

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

JOINVILLE

2022

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

C672a Coelho, Karina Munhoz de Paula Alves
Avaliação da pigmentação por melanina e da expressão de STAT6 e MITF em melanomas cutâneos / Karina Munhoz de Paula Alves Coelho; orientador Dr. Paulo Henrique Condeixa de França. – Joinville: Univille, 2023.

93 f.: il.

Tese (Doutorado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Melanoma. 2. Distúrbios de pigmentação da pele. 3. Fator de transcrição STAT6. 4. Prognóstico. I. França, Paulo Henrique Condeixa de (orient.). II. Título.

CDD 616.994

Termo de Aprovação

"Avaliação da Pigmentação por Melanina e da Expressão de *STAT6* e *MITF* em Melanomas Cutâneos"

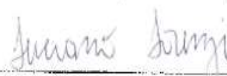
por

Karina Munhoz de Paula Alves Coelho

Tese julgada para a obtenção do título de Doutora 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.

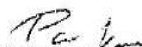


Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Orientador (UNIVILLE)




Prof. Dr. Luciano Lorenzi
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:



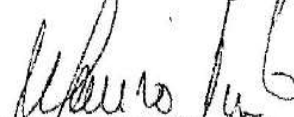
Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dr. Rafael Roesler
(UFRGS)



Prof. Dr. José Candido Caldeira Xavier Junior
(Instituto de Patologia de Araçatuba)



Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho
(UNIVILLE)

Joinville, 13 de maio de 2022

Tempo de viver

Se houver um tempo de retorno, eu volto.

Subirei, empurrando a alma com meu sangue
por labirintos e paradoxos – até inundar novamente o coração.

(Terei, quem sabe, o mesmo ardor de antigamente.)

Lya Luft – Perdas e Ganhos

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França pela presença constante, segura e serena que conduziu o desenvolvimento deste estudo com muita sabedoria, compreendendo, aceitando e estimulando as mais diferentes oportunidades que incentivam o desenvolvimento da ciência.

Aos membros da banca Prof. Dr. Rafael Roesler, Prof. Dr. José Cândido Caldeira Xavier Jr. e Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho que disponibilizaram o seu tempo para contribuir com seus conhecimentos para a evolução deste estudo.

Ao Prof. Arthur Fausto Siqueira Simões Junior, grande mestre, que contribuiu com seu conhecimento e entusiasmo pela ciência desde as primeiras etapas para o desenvolvimento deste estudo.

À Jaqueline Stall que participou de todas as etapas da construção deste estudo com muito interesse pela pesquisa. Ao Dr. Hercílio Fronza Júnior grande incentivador do desenvolvimento científico e à Dra. Beatriz Hornburg pelo incentivo ao estudo das doenças cutâneas. À Dra. Priscila Franczak que contribui com a análise estatística e à Dra. Bárbara Kunzler com as análises *in silico*. Ao Marcio Franciski, Rodrigo Blasius e Franciele Ferreira Wolf que contribuíram com a seleção de amostras e a realização das análises imuno-histoquímicas. Aos demais colaboradores do Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos (CEDAP) que participaram em alguma etapa do estudo.

Em especial, ao meu esposo, Acir Alves Coelho Junior, pela parceria durante mais essa jornada.

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 e ao CEDAP pela disponibilização das amostras, estrutura física e financiamento do material necessário para a realização deste estudo.

AVALIAÇÃO DA PIGMENTAÇÃO POR MELANINA E DA EXPRESSÃO DE STAT6 E MITF EM MELANOMAS CUTÂNEOS

RESUMO

Introdução: O melanoma cutâneo tem a exposição à luz solar como principal fator de risco ambiental. A melanina protege a pele dos raios UV evitando o desenvolvimento dos cânceres cutâneos. No entanto, paradoxalmente, está envolvida na gênese do melanoma e parece interferir no seu desfecho. A melanogênese é regulada principalmente pelo gene *MITF*, que pode ser inibido pela ativação da via JAK-STAT6 em melanócitos, através da IL-4, resultando na diminuição da pigmentação. No entanto, poucos estudos estão disponíveis sobre os genes desta via no melanoma. **Objetivo:** Determinar a expressão de STAT6 e MITF em relação à pigmentação dos melanomas e a associação destes com outros critérios clinicopatológicos. **Métodos:** Estudo transversal para avaliação histológica do grau de pigmentação de melanina em 201 amostras de melanomas primários e 28 metastáticos correspondentes. Análise imuno-histoquímica da expressão de STAT6 e de MITF em 91 amostras de melanomas primários e da sua associação com pigmentação e com critérios clinicopatológicos associados a prognóstico. Análise *in silico* para a avaliação dos níveis transcricionais de mRNA de STAT6 em associação ao grau de pigmentação dos melanomas. **Resultados:** Nos melanomas primários predominou o grau acentuado de pigmentação de melanina (n=70; 34,8%), seguido de moderado (n=63; 31,3%), discreto (n=47; 23,4%) e negativo (n=21; 10,5%). Os melanomas metastatizaram com grau de pigmentação semelhante ao respectivo melanoma primário (p=0,639). Observou-se associação entre o grau de pigmentação e as variáveis espessura, mitose e sobrevida global (p=0,001, <0,001 e 0,002, respectivamente). Identificou-se associação entre a expressão de MITF e pigmentação e espessura (p=0,007, p=0,043, respectivamente). Nas análises da expressão de STAT6 identificou-se associação com pigmentação pelo método de imuno-histoquímica (p=0,039) e nos níveis transcricionais de mRNA por análise *in silico* (p≤0,0001). **Conclusão:** O grau de pigmentação por melanina nos melanomas primários é um importante marcador histológico visto associar-se com sobrevida, critérios prognósticos e, nas correspondentes metástases, se apresenta com grau de

pigmentação semelhante. O nível transcricional do gene *STAT6* e a sua expressão imuno-histoquímica se correlacionam com os graus de pigmentação nos melanomas. O MITF é um marcador expresso na maioria dos melanomas e se associa com pigmentação, espessura e estadiamento tumoral.

Palavras chave: Melanoma, pigmentação, *STAT6*, MITF, prognóstico

EVALUATION OF MELANIN PIGMENTATION AND STAT6 AND MITF EXPRESSION IN CUTANEOUS MELANOMAS

ABSTRACT

Introduction: Cutaneous melanoma has exposure to sunlight as the main environmental risk factor. Melanin protects the skin from UV rays preventing the development of skin cancers. However, paradoxically, it is involved in the genesis of melanoma and seems to interfere with its outcome. Melanogenesis is mainly regulated by *MITF* gene, which can be inhibited by activating the JAK-STAT6 pathway in melanocytes, by IL-4, resulting in decreased melanogenesis. However, few studies are available on the genes of this pathway in melanoma. **Objectives:** To determine the expression of STAT6 and MITF in relation to the pigmentation of melanomas and their association with other clinicopathological criteria. **Methods:** Cross-sectional study for histological evaluation of the degree of melanin pigmentation in 201 samples of primary melanomas and 28 corresponding metastatic melanomas. Immunohistochemical analysis of STAT6 and MITF expression in 91 samples of primary melanomas and their association with pigmentation and with clinicopathological criteria associated with prognosis. In silico analysis for the assessment of transcriptional levels of STAT6 mRNA in association with the degree of pigmentation of melanomas. **Results:** In primary melanomas, the marked degree of melanin pigmentation predominated (n=70; 34.8%), followed by moderate (n=63; 31.3%), mild (n=47; 23.4%) and negative (n=21; 10.5%). The melanomas metastasized with a degree of pigmentation similar to the respective primary melanoma (p=0.639). An association was observed between the degree of pigmentation and the variables thickness, mitosis and overall survival (p=0.001, <0.001 and 0.002, respectively). An association was identified between MITF expression and pigmentation and thickness (p=0.007, p=0.043, respectively). In the analysis of STAT6 expression, an association with pigmentation was identified by immunohistochemistry (p=0,039)) and in the transcriptional levels of mRNA by in silico analysis (p≤0.0001). **Conclusion:** The degree of melanin pigmentation in primary melanomas is an important histological marker since it is associated with survival, prognostic criteria and, in the corresponding metastases, it presents with a

similar degree of pigmentation. The transcriptional level of the *STAT6* gene and its immunohistochemical expression correlate with the degrees of pigmentation in melanomas. MITF is a marker expressed in most melanomas and is associated with pigmentation, thickness and tumor staging.

Keywords: Melanoma, pigmentation, STAT6, MITF, prognosis.

EVALUACIÓN DE LA PIGMENTACIÓN DE MELANINA Y EXPRESIÓN DE STAT6 Y MITF EN MELANOMAS CUTÁNEOS

RESUMEN

Introducción: La exposición a la luz solar es el principal factor de riesgo ambiental para el melanoma cutáneo. La melanina protege la piel de los rayos UV, previniendo el desarrollo de cánceres de piel. Sin embargo, paradójicamente, está implicado en la génesis del melanoma y parece interferir en su evolución. La melanogénesis está regulada principalmente por el gen MITF, que puede inhibirse activando la vía JAK-STAT6 en los melanocitos, a través de la IL-4, lo que resulta en una disminución de la pigmentación. Sin embargo, se dispone de pocos estudios sobre los genes de esta vía en el melanoma.

Objetivo: Determinar la expresión de STAT6 y MITF en relación con la pigmentación de los melanomas y su asociación con otros criterios clinicopatológicos. **Métodos:** Estudio transversal para evaluación histológica del grado de pigmentación melánica en 201 muestras de melanomas primarios y 28 metastásicos correspondientes. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de STAT6 y MITF en 91 muestras de melanomas primarios y su asociación con la pigmentación y criterios clinicopatológicos asociados al pronóstico.

Análisis in silico para la evaluación de los niveles transcripcionales de ARNm de STAT6 en asociación con el grado de pigmentación de los melanomas. **Resultados:** En los melanomas primarios predominó el grado acentuado de pigmentación melánica (n=70; 34,8%), seguido de moderado (n=63; 31,3%), leve (n=47; 23,4%) y negativo (n=21; 10,5%). Los melanomas metastatizaron con un grado de pigmentación similar al melanoma primario respectivo (p=0,639). Hubo asociación entre el grado de pigmentación y las variables grosor, mitosis y supervivencia global (p=0,001, <0,001 y 0,002, respectivamente). Se identificó una asociación entre la expresión de MITF y la pigmentación y el grosor (p=0,007, p=0,043, respectivamente). En los análisis de expresión de STAT6 se identificó asociación con pigmentación por método inmunohistoquímico (p=0.039) y con niveles transcripcionales de mRNA por análisis in silico (p≤0.0001). **Conclusión:** El grado de pigmentación por melanina en los melanomas primarios es un importante marcador histológico ya que se asocia con supervivencia, criterios pronósticos y, en las metástasis correspondientes, se presenta con un grado de pigmentación similar. El nivel transcripcional del gen STAT6 y su expresión inmunohistoquímica se correlacionan con los grados de pigmentación en los melanomas. MITF es un marcador expresado en la

mayoría de los melanomas y está asociado con la pigmentación, el grosor y la estadificación del tumor.

Palabras clave: melanoma, pigmentación, STAT6, MITF, pronóstico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Incidência e taxa de mortalidade por melanoma, no mundo, em 2018.	05
Figura 2	Taxas de casos novos de melanoma por 100.000 pessoas de acordo com a raça/etnia e gênero, no período de 2013 a 2017.	07
Figura 3	Profundidade da penetração das radiações UV-A, UV-B e UV-C no tecido cutâneo.	10
Figura 4	Papel da melanina nos efeitos imediatos e tardios nos danos ao DNA pelas radiações UV-A e UV-B.	11
Figura 5	Distribuição, por subtipos histológicos, estudada em uma população, no Brasil, em 2018.	14
Figura 6	Graus de elastose solar: 0 ausência de elastose, 1 presença de elastose em fibras isoladas, 2 elastose em grupos de fibras elásticas, 3 presença de material basofílico com perda da textura fibrilar.	15
Figura 7	Imagens histológicas e respectivas representações gráficas dos infiltrados linfocitários: A e B, <i>brisk</i> ; C e D <i>non brisk</i> , E ausente.	16
Figura 8	A) Melanoma amelanótico mostrando ausência de grânulos de melanina de coloração acastanhada no citoplasma das células neoplásicas. B) Melanoma melanótico mostrando a presença de grânulos de melanina de coloração acastanhada no citoplasma das células neoplásicas.	18
Figura 9	Classificação do tumor primário melanoma, conforme a AJCC, 8 ^o Edição.	20
Figura 10	Classificação dos linfonodos regionais, conforme a AJCC, 8 ^a Edição.	21
Figura 11	Classificação da metástase à distância, conforme a AJCC, 8 ^a Edição.	21

Figura 12	Estadiamento clínico e patológico, conforme AJCC, 8ª Edição.	22
Figura 13	Melanócitos localizados na camada basal da epiderme e transferem a melanina para os ceratinócitos.	23
Figura 14	Via bioquímica da formação de eumelanina e feomelanina.	25
Figura 15	Via de pigmentação através da ação da radiação UV sobre o DNA, que resulta na ativação do MCR1 e MITF.	26
Figura 16	Citocina induz dimerização e fosforilação dos receptores de JAK que fosforila e ativa o STAT para posterior translocação para o núcleo.	29
Figura 17	Estímulos ambientais produzem fatores inflamatórios envolvidos na melanogênese.	30
Figura 18	MITF é o regulador mestre de muitos alvos que são relevantes para os melanócitos normais e para os melanomas.	31
Figura 19	Imagens de amostras representativas da interpretação dos graus de elastose solar: a) ausência de elastose, b) presença de elastose em fibras isoladas, c) elastose em grupos de fibras elásticas, d) presença de material basofílico com perda da textura fibrilar.	39
Figura 20	Imagens de amostras representativas da interpretação dos graus dos infiltrados linfocitários: a) e b), <i>brisk</i> ; c) <i>nonbrisk</i> , d) ausente.	39
Figura 21	Imagens de amostras representativas da interpretação dos graus de pigmentação dos melanomas: a) acentuado b), moderado; c) discreto, d) ausente.	40
Figura 22	Imagens de melanomas primários com diferentes <i>scores</i> de expressão imuno-histoquímica de MITF. a) <i>score</i> 0; b) <i>score</i> 80; c) <i>score</i> 160 d) <i>score</i> 300.	41
Figura 23	Imagens de melanomas primários com diferentes <i>scores</i> de expressão imuno-histoquímica de STAT6. a) <i>score</i> 0; b) <i>score</i> 40; c) <i>score</i> 100 d) <i>score</i> 300.	42

LISTA DE FIGURAS DOS ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 Gradações histológicas de pigmentação por melanina nos melanomas primários: a) acentuada, b) moderada, c) discreta e d) ausente (negativa). Coloração de hematoxilina e eosina. Aumento de 200x. 63
- Figura 2 Curva de Kaplan-Meier demonstrando a relação de sobrevida global e graus de pigmentação de melanina nos melanomas: azul claro - pigmentação acentuada, verde - moderada, vermelho - discreta, azul escuro - negativa. 65
- Figura 3 Imagens de amostras representativas da análise imuno-histoquímica de STAT6: a) ausência de expressão em ceratinócitos de pele normal, b) expressão forte e predominantemente nuclear em tumor fibroso solitário, c) expressão fraca e predominantemente citoplasmática em amostra de melanoma com score ≤ 85 e d) expressão forte e predominantemente citoplasmática em amostra de melanoma com score >85 . 66
- Figura 4 Níveis transcricionais do gene *STAT6* nos diferentes scores de pigmentação em melanomas. * $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0001$. 67

ARTIGO 2

- Figura 1 Expressão imuno-histoquímica de MITF: a) pele normal com expressão em melanócitos normais e ausência de expressão em ceratinócitos, b) melanoma com ausência de expressão, c) melanoma 80

LISTA DE TABELAS DOS ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1	Caracterização clínico-patológica da casuística estudada.	62
Tabela 2	Associação entre o grau histológico de pigmentação dos melanomas primários e critérios clínico-patológicos, pigmentação na metástase e sobrevida global.	64

ARTIGO 2

Tabela 1	Associação entre a expressão imuno-histoquímica de MITF nos melanomas primários com critérios clínico-patológicos.	81
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>	Comitê Americano Conjunto sobre Câncer
BRAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma kinase B</i>	Quinase B do fibrossarcoma rapidamente acelerado
CAPES		Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC-TT	Cytosine,Cytosine-thymine,thymine	Citosina, citosina e timina, timina
<i>CDKN2A</i>	<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
CNS		Conselho Nacional de Saúde
CONEP		Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPD	<i>Cyclobutanepirimidinedimer</i>	Dímeros de pirimidina de ciclobutano
CT	<i>Cytosine-thymine.</i>	Citosina, timina
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyteantigen 4</i>	Antígeno-4 de linfócito T citotóxico
Dct	<i>Dopachrometautomerase</i>	Dopacromotautomerase
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Ácido desoxirribonucleico
HMB45	<i>Anti-Human Melanosome</i>	anti-Melanossomo humano
IgG	<i>Immunoglobulin G</i>	Imunoglobulina G
IHQ	<i>Immunohistochemistry</i>	Imuno-histoquímica
IL-13	<i>Interleukin 13</i>	Interleucina 13
IL-4	<i>Interleukin 4</i>	Interleucina 4

IARC	<i>International Agency for Research On Cancer</i>	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
INCA		Instituto Nacional do Câncer
JAK	<i>Janus kinase</i>	Janus quinase
JAK2	<i>Janus kinase-2</i>	Janus quinase-2
KIT	<i>Tyrosine-proteinkinase</i>	Proteína tirosina-quinase
MCR-1	<i>Mobile colistin resistance</i>	Resistência à colistina mobilizada
microRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i>	Micro ácido ribonucleico
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>	Ácido ribonucleico mensageiro
MEK	<i>MAP kinase-ERK kinase</i>	MAP quinase-ERK quinase
MITF	<i>Microphthalmia-associated transcription</i>	Fator de transcrição de microftalmia
NF1	<i>Neurofibromatosis type 1</i>	Neurofibromatos tipo 1
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>	Homólogo do oncogene viral RAS do neuroblastoma
PD1	<i>Programmed cell death protein 1</i>	Proteína de morte celular programada 1
6-4 PPS	<i>6-4 photoproducts</i>	6-4 fotoprodutos
S100	<i>S100 proteins</i>	Proteínas S100
SIM		Sistema de Informações de Mortalidade
SOX-10	<i>Sry-Related HMG-Box Gene 10</i>	<i>Gene 10 de HMG-Box relacionado a Sry</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
STAT6	<i>Signal transducer and activator of transcription-6</i>	Transdutor de sinal e ativador da transcrição-6
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	Transcriptase reversa da telomerase
Th2	<i>T helper-2</i>	

TIL	<i>Tumor-infiltrating lymphocytes</i>	Linfócitos infiltrantes tumorais
TNM	<i>Tumor, node, metastasis</i>	Tumor, linfonodo, metástase
TYR	<i>Tyrosine</i>	Tirosina
TYRP -1	<i>Tyrosinase-related protein 1</i>	Tirosinase relacionada à proteína 1
UNIVILLE		Universidade da Região de Joinville
UV		Ultravioleta
UV-A		Ultravioleta - A
UV-B		Ultravioleta - B
UV-C		Ultravioleta - C

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
2	OBJETIVOS	03
2.1	OBJETIVO GERAL	03
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	03
3	REVISÃO DE LITERATURA	04
3.1	MELANOMA	04
3.1.1	História e interdisciplinaridade	04
3.1.2	Epidemiologia	05
3.1.3	Fatores de Risco	08
3.1.3.1	Fatores de risco individuais e genéticos	08
3.1.3.2	Fatores de risco ambientais	08
3.1.3.2.1	Exposição a radiação ultravioleta	09
3.1.3.2.2	Exposição a produtos químicos	11
3.1.4	Patologia	12
3.1.4.1	Tipos histológicos	13
3.1.4.2	Dano solar	14
3.1.4.3	Linfócitos infiltrantes de tumor	16
3.1.4.4	Ulceração	17
3.1.4.5	Índice de Breslow	17
3.1.4.6	Taxa de mitótica	17
3.1.4.7	Pigmentação	18
3.1.4.8	Marcadores moleculares	19
3.1.4.9	Estadiamento tumoral	19
3.1.4.10	Sobrevida	22
3.2	MELANOGÊNESE	23
3.2.1	Conceito	23
3.2.2	Biossíntese da melanina	24
3.2.3	Genética da melanogênese	25
3.2.4	Melanomas melanóticos e amelanóticos	26
3.3	STAT6 E MITF	28

3.3.1	STAT6	28
3.3.2	MITF	30
3.4	TERAPÊUTICA	32
4	METODOLOGIA	35
4.1	ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA	35
4.1.1	Tipo de estudo	35
4.1.2	Local de estudo	35
4.1.3	Período de estudo	35
4.1.4	Amostras e critérios de inclusão	36
4.1.5	Procedimentos metodológicos	36
4.1.5.1	Banco de dados	36
4.1.5.2	Análise histológica	37
4.1.5.3	Análise imuno-histoquímica	37
4.1.5.4	Leitura e interpretação dos resultados	38
4.1.6	Estatística	42
4.2	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	42
4.3	ASPECTOS ÉTICOS	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO	46
7	REFERÊNCIAS	47
APÊNDICES		56
A	Artigo 1 - A expressão de STAT6 se associa com o grau de pigmentação dos melanomas	56
B	Artigo 2 - A expressão de MITF se associa com o grau de pigmentação e espessura do melanoma	74
C	Tabelas com resultados	86
ANEXOS		
I	Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE	88
II	Comprovantes de submissão dos artigos à revista Pathology – Research and Practice	92

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é uma neoplasia cutânea agressiva, que resulta da rápida proliferação de melanócitos, com prognóstico ruim quando não tratado precocemente (PEARLMAN et al, 2017). A melanogênese, que resulta na pigmentação dos melanomas, é regulada principalmente pelo fator de transcrição de microftalmia (*MITF*) (VACHTENHEIM, 2017). O *MITF* é um gene essencial para o desenvolvimento dos melanócitos, controlando a diferenciação, proliferação e sobrevivência celular. Devido ao seu papel dominante, este gene foi denominado de "mestre regulador transcricional da linhagem de melanócitos" (SWOBODA et al, 2018, KAWAKAMI; FISHER, 2017).

O *MITF* pode ser inibido pela ativação da via Janus cinase transdutora de sinal e ativadora da transcrição 6 (*JAK-STAT6*) em melanócitos, através da IL-4, resultando na diminuição da melanogênese (CHOI et al, 2013; HOSSAIN et al, 2021). Porém, poucos estudos estão disponíveis sobre os genes da via *JAK-STAT* no melanoma cutâneo (PAN et al, 2020).

O melanoma tem forte associação com fatores ambientais, sendo a exposição solar o maior fator de risco (HIGGINS et al, 2015). Sua frequência está aumentando em muitos países e, no Brasil, as maiores taxas encontram-se na Região Sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). A prevalência na região de Joinville, Santa Catarina, é alta e está associada, além da exposição à radiação solar, aos fototipos I e II, prevalentes nesta região (STEGLICH et al, 2018). Os fototipos baixos apresentam quantidades menores de melanina, especialmente da eumelanina, que protege as células da epiderme da radiação (MCKENZIE, 2017; SLOMINSKI et al, 2014a). Paradoxalmente, estudos mostram um envolvimento da melanina na gênese do melanoma através de dano oxidativo ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (GAJULA et al, 2015).

Alguns estudos não encontraram associações significativas entre a pigmentação dos melanomas e prognóstico (COCHRAN, 1969; LARSEN; GRUDE, 1978). No entanto, Balch et al (1978) observou taxa de sobrevivência maior nos pacientes com melanomas pigmentados. Sarna et al (2018), referiu que a melanina é responsável por propriedades mecânicas das células de melanoma, podendo inibir

o processo de metástase. Ainda, a presença do pigmento de melanina, especialmente nas metástases, pode ter potencial implicação na resposta terapêutica (SLOMINSKI et al, 2015).

Portanto, avaliar a pigmentação de melanomas primários em correlação com a de suas metástases, com a expressão de MITF e de STAT6, sobrevida global e outros critérios clínico-patológicos pode contribuir para um melhor entendimento do comportamento desta neoplasia.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o grau de pigmentação e a expressão de STAT6 e de MITF em melanomas cutâneos primários e sua associação com critérios clínico-patológicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a associação entre o grau de pigmentação em melanomas primários com espessura, mitose e sobrevida global.
- b) Determinar a associação entre o grau de pigmentação em melanomas primários e respectivas metástases.
- c) Investigar a associação entre a pigmentação nos melanomas primários com a expressão imuno-histoquímica de STAT6 e MITF e de níveis transcricionais de mRNA do STAT6.
- d) Avaliar a associação da expressão imuno-histoquímica de MITF em melanomas primários com taxa mitótica, linfócitos infiltrantes de tumor, estadiamento, tipo histológico e elastose solar.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MELANOMA

O câncer de pele é classificado em dois grupos: melanoma e não melanoma. Destes, o melanoma é a forma mais agressiva (SAMPLE; HE, 2018) e, apesar de não ser a neoplasia maligna cutânea mais frequente, é responsável por 90% das mortes associadas a tumores cutâneos (GARBE et al, 2020a). É uma neoplasia extremamente resiliente para a qual não existe terapia eficaz quando progride para metástase (VACHTENHEIM, 2017).

Os melanócitos, células precursoras do melanoma, têm origem na crista neural e, durante o desenvolvimento fetal, migram para diferentes áreas do corpo como pele, meninges, mucosas e olhos. Portanto, o melanoma pode surgir em qualquer desses locais, embora seja mais comum na pele (SHAKHOVA, 2014; ANTUNES et al., 2019).

Os melanomas geralmente são pigmentados devido à presença de melanina no citoplasma das células, porém alguns podem ser amelanóticos (GARBE et al, 2020a).

3.1.1 História e interdisciplinaridade

Os primeiros registros de melanoma na literatura médica ocidental foram em 1651, por Highmore e Bonet, e em 1757, por Henrici e Nothnagel, que descreveram tumores pretos que se disseminaram pelo corpo de seus pacientes (DAVIS et al, 2019). A primeira remoção cirúrgica do tumor foi em 1787, por John Hunter, que descreveu uma lesão “macia e preta” na mandíbula de um homem de 35 anos. Várias características do melanoma estavam descritas neste caso, incluindo pigmentação e propensão para metástase (VIJAYASARADHI; HOUGHTON,1995).

O melanoma fascina médicos, biólogos e imunologistas porque os estudos interdisciplinares desta neoplasia fornecem informações importantes sobre a resposta imune ao câncer e formam paradigmas significativos da transformação maligna (VIJAYASARADHI; HOUGHTON,1995). A interdisciplinaridade no estudo do

melanoma é evidente ainda devido à associação deste com os fatores etiológicos ambientais e genéticos (CUST et al, 2018).

3.1.2 Epidemiologia do melanoma

O melanoma continua sendo um importante problema de saúde pública global (ARNOLD et al, 2022). Os casos de melanoma estão aumentando em todo o mundo, especialmente onde pessoas de pele clara recebem exposição excessiva ao sol (GARBE et al, 2020a). Austrália, Nova Zelândia, regiões da Europa e América do Norte têm as maiores incidências e taxas de mortalidade do mundo, conforme a *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, em 2018. A figura 1 mostra a incidência e taxa de mortalidade do melanoma, em 2018, no mundo.

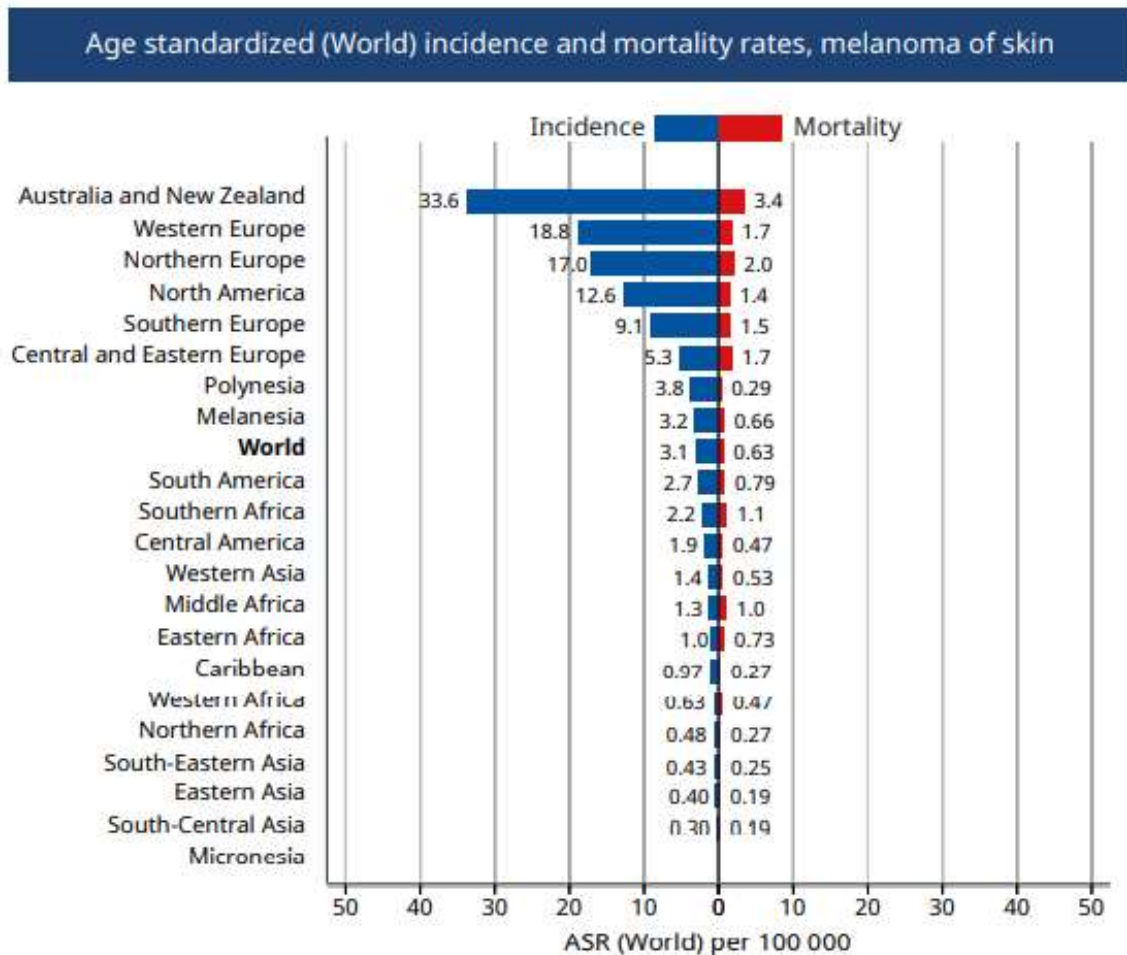


Figura 1. Incidência e taxa de mortalidade por melanoma, no mundo, em 2018. Fonte: IARC, 2018.

Uma avaliação epidemiológica de dados globais de câncer, estimou que houve 325.000 casos novos de melanoma com 57.000 mortes, em 2020 e que se as taxas de 2020 permanecerem estáveis, estima-se que a carga global do melanoma aumente para 510.000 casos novos até 2040, com 96.000 mortes (ARNOLD et al, 2022).

No Brasil, em 2018, a mortalidade por melanoma correspondeu a 1791 casos, 1.038 homens e 753 mulheres. Na região sul do Brasil, o melanoma é mais incidente quando comparado com as demais regiões. As taxas são de 10,05 para homens e de 7,99 para mulheres, por 100.000 pessoas, conforme análise por unidade de federação pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Um estudo realizado em Joinville, município da região do sul do país, revelou uma incidência de melanoma mais alta que as demais regiões e um aumento no número de casos nos últimos anos. Nesta cidade, o coeficiente de incidência ajustado para a idade da população mundial, entre 2003 e 2006 foi de 11,8 e entre 2011 e 2014 foi de 17,5 para 100.000 habitantes, correspondendo a um aumento de 48,3% entre estes períodos (STEGGLISH et al, 2018).

O predomínio do melanoma, no mundo, é maior em homens da raça branca e as menores taxas estão na população da raça negra (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2020). A figura 2 mostra os casos novos de melanoma, no mundo, por 100.000 pessoas de acordo com a raça/etnia e gênero.



Figura 2. Taxas de casos novos de melanoma por 100.000 pessoas de acordo com a raça/etnia e gênero, no período de 2013 a 2017. Fonte: NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2020.

Enquanto o melanoma em indivíduos da raça branca é mais comumente do subtipo histológico de disseminação superficial e mais frequentemente afeta o tronco em homens e as pernas em mulheres, o melanoma em pessoas da raça negra tem mais probabilidade de ser do subtipo histológico lentiginoso acral, que afeta as palmas das mãos e plantas dos pés. Vários estudos relataram desfechos piores em pacientes com tipo de pele mais escura e melanoma de mãos e pés (TOD et al, 2019).

Pacientes com albinismo oculocutâneo, que é caracterizado pela deficiência na biossíntese de melanina, tem uma maior predisposição para câncer de pele. No entanto, a ocorrência de melanoma é rara nestes pacientes em comparação com os carcinomas. Nos albinos, os melanomas são frequentemente amelanóticos (OZAKI et al, 2017, RUIZ-SANCHEZ et al, 2020). É possível que a progressão para o melanoma dependa da própria presença do pigmento de melanina (LIU-SMITH et al, 2015).

3.1.3 Fatores de risco

Os fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma cutâneo podem ser classificados em individuais, genéticos e ambientais (SEGATTO et al, 2015).

3.1.3.1 Fatores de risco individuais e genéticos

Os fatores individuais relacionados ao risco de desenvolver melanoma são: número aumentado de nevos comuns, nevos congênitos grandes, nevos atípicos, história pessoal e familiar de melanoma, cor da pele, do cabelo e dos olhos (ACOSTA et al, 2009). Estes fenótipos também são determinados geneticamente (SEGATTO et al, 2015).

O fototipo baixo, aquele em que a pele tende a queimar ao sol e não bronzear, é um dos fatores de risco individuais mais associados ao melanoma. Neste fototipo, o gene do receptor de melanocortina-1 (*MC1-R*) que codifica o receptor do hormônio estimulador dos melanócitos, foi identificado como o primeiro gene de penetrância baixa-média associado ao risco de melanoma (GARBE et al, 2020a). O *MCR-1* é um dos principais genes que determinam a cor da pele e do cabelo. Há evidências de que ele atue por meio de vias pigmentares e não pigmentares para influenciar o desenvolvimento do melanoma (CUST et al, 2018).

Cerca de 80% dos melanomas carregam mutações com assinatura ultravioleta citosina-timina (CT) ou citosina, citosina - timina, timina (CC-TT) (SEGATTO et al, 2015, CUST et al, 2018). O *MITF* foi identificado como um gene de susceptibilidade ao melanoma de média penetrância. O alelo variante *MITF* E318K é relativamente incomum na população, prevalência de cerca de 1%, e está associado a um risco aumentado de 2 a 3 vezes de melanoma (CUST et al, 2018).

3.1.3.2 Fatores ambientais

A exposição à radiação ultravioleta é o fator ambiental melhor estabelecido. No entanto, outros fatores menos estudados parecem estar envolvidos na gênese do melanoma, como a exposição a substâncias químicas, incluindo os pesticidas (SEGATTO et al, 2015).

3.1.3.2.1 Exposição à radiação ultravioleta

Em resposta à exposição aos raios ultravioleta ocorre a síntese de melanina. A eumelanina cumpre funções fotoprotetoras na pele enquanto a feomelanina pode contribuir para a carcinogênese cutânea ao produzir radicais livres (BRESSAC-DE-PAILLERETS et al, 2002).

Existem evidências que a exposição intermitente ao sol, principalmente em atividades recreativas, está associada ao risco aumentado de desenvolvimento do melanoma cutâneo (DIFFEY, 2004). Possivelmente, isso se deve ao menor teor de melanina e menor capacidade de reparo de DNA da pele exposta intermitentemente em comparação com a pele habitualmente exposta (CUST et al, 2018). A exposição solar aguda causa imunossupressão cutânea enquanto a exposição solar crônica produz alterações cutâneas que representam mecanismos de defesa: elevação no número de camadas celulares da epiderme, de melanócitos e de células imunologicamente ativas (BEZERRA et al, 2011).

Estima-se que a maioria dos melanomas cutâneos seja causada pela exposição à radiação UV. Dois tipos de radiação UV são os principais responsáveis por causar danos cancerígenos à pele: a ultravioleta – A (UV-A) (315 nm-400 nm) e ultravioleta – B (UV-B) (280 nm-315 nm). A UV-A é a mais abundante na superfície da Terra e penetra mais profundamente na derme do que o UV-B, mas é menos genotóxica. Ultravioleta – C (UV-C) atinge somente as camadas mais superficiais da epiderme (SAMPLE; HE, 2018, CUST et al, 2018). A figura 3 mostra os níveis de penetração das radiações no tecido cutâneo.

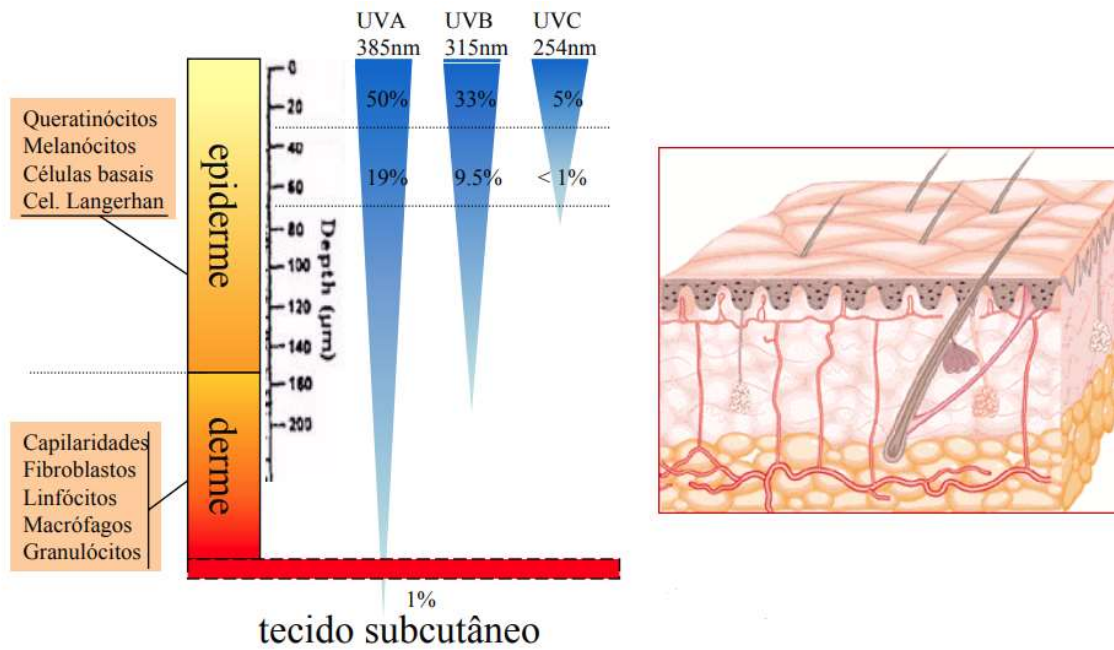


Figura. 3. Profundidade da penetração das radiações UV-A, UV-B e UV-C no tecido cutâneo. Fonte: Adaptada de CORREIA, 2007.

A radiação UV-A causa melanoma por meio de danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) induzidos por estresse oxidativo e a indução desta neoplasia, por esta radiação, requer a presença de pigmento de melanina. A radiação UV-B inicia o melanoma de uma maneira independente de pigmento e está associada a danos diretos ao DNA na forma de fotoprodutos, incluindo dímeros de pirimidina, ciclobutanos (CPDs) e 6-4 fotoprodutos (6-4PPs) (SAMPLE; HE, 2018; NOONAN et al, 2012). A figura 4 ilustra os danos causados por estas radiações na presença e ausência de melanina.

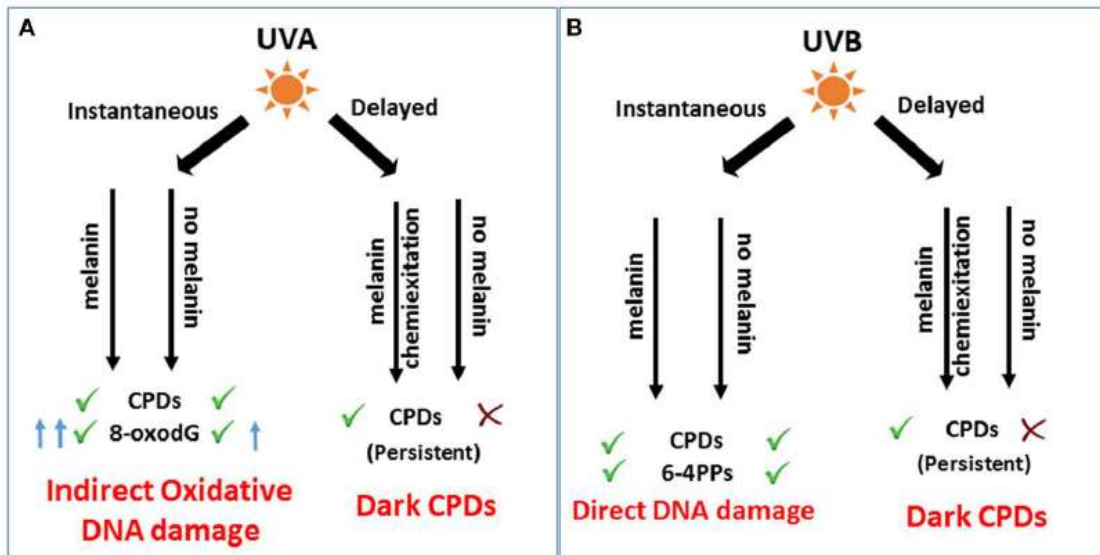


Figura 4. Papel da melanina nos efeitos imediatos e tardios nos danos ao DNA pelas radiações a) UV-A e b) UV-B. Fonte: GAJULA et al, 2015.

A relação entre a redução da camada de ozônio e o desenvolvimento do melanoma tem sido discutida no que se refere ao comprimento de onda para iniciação e desenvolvimento deste câncer. Evidências suportam a hipótese de que a radiação UV-B, que é filtrada pela camada de ozônio, seja crítica para início do melanoma, embora funcione apenas como uma contribuição à exposição à UV-A (NORVAL et al, 2011).

O bronzeamento artificial é comum nos países ocidentais, especialmente entre adolescentes e adultos jovens, e também está associado a um risco aumentado de melanoma. A radiação UV-A é a principal fonte de luz usada no bronzeamento artificial e pode atingir doses 12 vezes maiores que a do sol (CUST et al, 2018, SAMPLE; HE, 2018).

3.1.3.2.2 Exposição a produtos químicos

O melanoma cutâneo tem sido associado à exposição ocupacional a pesticidas, sendo que alguns sugerem uma relação também com a exposição domiciliar a estas substâncias (BLOTTA; BAKOS, 2009).

Segatto et al, em 2015, encontrou em seu estudo realizado no Rio Grande do Sul, Brasil, um aumento de 4,23 vezes no risco de melanoma em indivíduos com histórico de exposição ocupacional a agrotóxicos. Após a exclusão de indivíduos com exposição ocupacional a agrotóxicos, o risco associado ao uso doméstico foi inequívoco. De acordo com dados do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, o glifosato e seus sais representam os principais pesticidas ocupacionais utilizados no Brasil e no Rio Grande do Sul. Neste estudo, os compostos mais usados como pesticidas internos foram os piretróides (SEGATTO et al, 2015).

Os pesticidas induzem a transformação maligna de células *in vitro* e *in vivo* por dano ao DNA, indução de mutação, estresse oxidativo e redução da imunidade mediada por células T e da produção de citocinas (SEGATTO et al, 2015; FORTES et al, 2016).

Há um possível efeito sinérgico entre agrotóxicos e exposição solar para o desenvolvimento de melanoma cutâneo. Esse fato pode ser explicado pela elevação da temperatura da pele, causada pela radiação UV, que aumenta o fluxo sanguíneo e a sudorese, fatores que facilitam a absorção transcutânea de produtos químicos (FORTES et al. 2016).

Uma revisão sistemática sobre o câncer relacionado ao trabalho encontrou estudos que demonstraram a associação do melanoma em trabalhadores da indústria de semicondutores, trabalhadores expostos a solventes e outros produtos químicos da indústria de computadores, tricloroetileno, óleo mineral, arsênio e mercúrio (CHAGAS et al, 2013).

3.1.4 Patologia

O estudo histopatológico, padrão ouro para o diagnóstico do melanoma, relata informações para estabelecer estadiamento, tratamento e prognóstico (GARBE et al, 2020a). Características histológicas que geralmente fazem parte dos laudos

anatomopatológicos são: tipo histológico, espessura de Breslow, nível de Clark, infiltrado inflamatório, taxa mitótica, ulceração, regressão, invasão linfovascular, neurotropismo, *status* do linfonodo sentinela, depósitos microssatélites e margens de ressecção (CAP, 2021). O índice Breslow, que é a medida da espessura vertical do melanoma, representa o fator prognóstico mais importante para o comportamento clínico do melanoma (IVAN; PRIETO, 2011).

3.1.4.1 Tipos histológicos

O melanoma cutâneo quando confinado à epiderme é chamado de *in situ* e quando os melanócitos neoplásicos invadem a derme é chamado de invasivo (GARBE et al, 2020a). É classificado conforme suas características microscópicas em tipos histológicos e os mais frequentemente encontrados são: de disseminação superficial, nodular, lentigo maligno, lentiginoso acral (OCANHA-XAVIER et al, 2018).

O tipo de disseminação superficial apresenta fase de crescimento radial com disseminação pagetoide. O nodular é caracterizado por crescimento vertical. O lentigo maligno melanoma apresenta proliferação lentiginosa de melanócitos neoplásicos na junção dermoepidérmica, ninhos na derme e melanócitos perifolicular. O lentiginoso acral apresenta proliferação irregular e pode evoluir com área nodular, invasiva. Outros subtipos menos comuns podem ser indentificados, dentre eles o desmoplásico, que é definido como uma variante do de células fusiformes em que as células malignas são separadas por fibras de colágeno ou estroma fibroso (GARBE et al, 2020a). A figura 5 mostra imagens de tipos histológicos e a sua proporção em um estudo realizado no Brasil, em 2018.

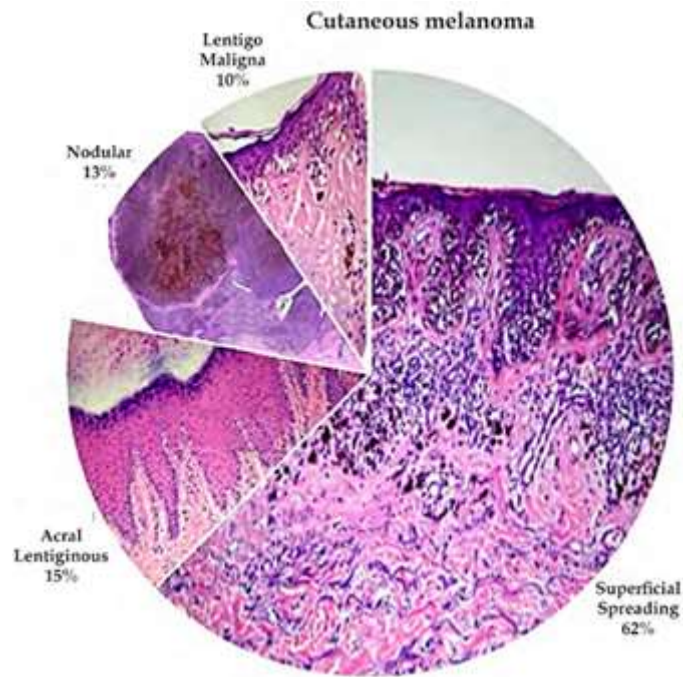


Figura 5. Distribuição por subtipos histológicos estudada em uma população, no Brasil, em 2018. Fonte: OCANHA-XAVIER et al, 2018.

A relevância prognóstica desta classificação em subtipos histológicos é controversa (IVAN; PRIETO, 2011) e não está incluída como fator prognóstico na atual edição do sistema de estadiamento do *American Joint Committee on Cancer* (AMIN et al, 2017).

3.1.4.2 Dano solar

Acredita-se que a elastose solar seja o principal indicador do grau de dano solar cumulativo. Em 1896, Unna observou a coloração do tecido elástico, azulada, na derme superior e relatou como degeneração basofílica que representa a elastose solar. O desenvolvimento desta elastose está inversamente relacionado à quantidade de pigmento na pele e diretamente relacionado à intensidade e ao tempo total cumulativo de exposição solar (MOON; OH, 2001).

Os melanomas que surgem na pele exposta ao sol são classificados também de acordo com o dano solar cumulativo, avaliado na biópsia pelo grau de elastose

solar. A figura 6 mostra imagens histológicas com os graus de elastose solar (WHO,, 2018).

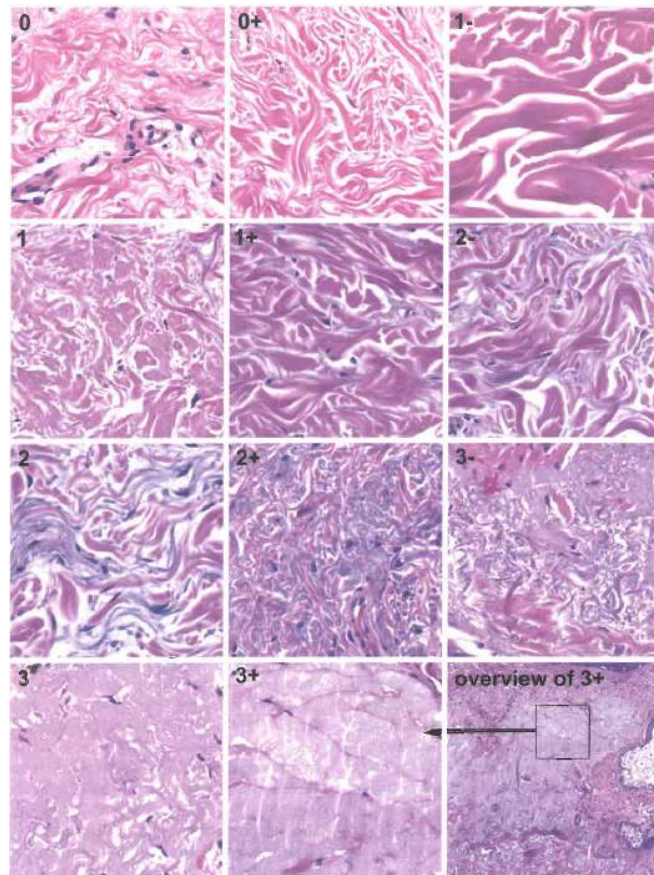


Figura 6. Graus de elastose solar: 0. ausência de elastose, 1. presença de elastose em fibras isoladas, 2. elastose em grupos de fibras elásticas, 3. presença de material basofílico com perda da textura fibrilar. Fonte: WHO, 2018.

O melanoma associado ao baixo dano solar cumulativo é o de disseminação superficial e os associados ao alto dano solar cumulativo, são o lentigo maligno melanoma e o melanoma desmoplásico (GARBE et al, 2020a). Os melanomas que surgem sem associação etiológica à radiação UV são: melanoma de Spitz, melanoma acral, melanoma de mucosas, melanoma que surge em nevo congênito, melanoma que surge em nevo azul e melanoma uveal. O melanoma nodular e o melanoma nevoide apresentam associação variável com a exposição solar (WHO, 2018). Características moleculares distintas são identificadas em tumores com diferentes graus de dano solar e localizações anatômicas (GARBE et al, 2020a).

3.1.4.3 Linfócitos infiltrantes de tumor

Os linfócitos no microambiente tumoral constituem um componente crítico da resposta imune aos tumores e a presença de linfócitos infiltrantes do tumor (TIL) se correlaciona com o prognóstico da doença (MIHM; MULÉ, 2015). Um infiltrado evidente ativo se correlaciona com melhor sobrevida (IVAN; PRIETO, 2011).

Os padrões clássicos de TILs são: a) infiltrado *brisk*, quando TILs estão presentes difusamente em todo o tumor ou concentrada na sua periferia; b) infiltrado *nonbrisk*, quando áreas com TILs associados ao tumor alternam com áreas tumorais sem infiltração de TIL; c) ausente, quando os linfócitos são totalmente ausentes ou presentes na região peritumoral, sem contato evidente com células de melanoma (MIHM; MULÉ, 2015, BOSISIO; VAN DEN OORD, 2017). A figura 7 ilustra os padrões de TIL no melanoma.

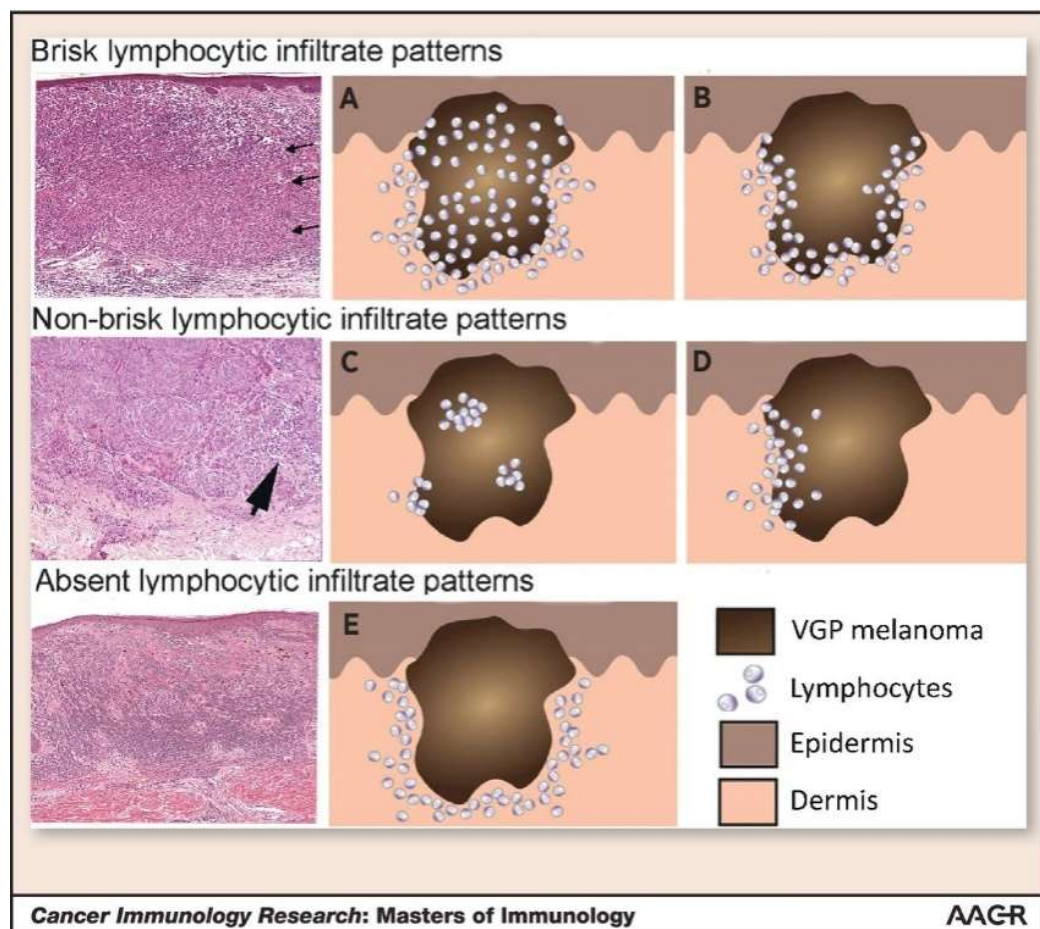


Figura 7. Imagens histológicas e respectivas representações gráficas dos infiltrados linfocitários: A e B, *brisk*; C e D, *non brisk*, E ausente. Fonte: MIHM; MULÉ, 2015.

3.1.4.4 Ulceração

A ulceração do melanoma é definida pela combinação dos seguintes critérios: alteração na espessura total da epiderme (incluindo ausência de estrato córneo e de membrana basal), evidência de resposta do hospedeiro (ou seja, deposição de fibrina, neutrófilos) e adelgaçamento, apagamento ou hiperplasia reativa da epiderme circundante (GARBE et al, 2020a).

A presença de ulceração é considerada um fator prognóstico independente e as taxas de sobrevida de pacientes com melanoma ulcerado são menores do que aquelas de pacientes com melanoma não ulcerado de espessura semelhante (IVAN; PRIETO, 2011). Balch *et al.*, em 1978, demonstraram uma redução de 55% a 80% na sobrevida de pacientes com ulceração em comparação com aqueles sem ulceração.

3.1.4.5 Índice de Breslow

Índice de Breslow é a espessura histológica do tumor, desde a camada granular da epiderme até o ponto mais profundo de invasão, e é medida na amostra com uma escala de micrômetro óptico (GARBE et al, 2020a).

Breslow propôs que medir a espessura vertical do melanoma é uma boa ferramenta para prever o potencial metastático. Essa medição é o fator prognóstico mais importante para o comportamento clínico do melanoma e está diretamente relacionado ao volume tumoral. Isso explica sua acurácia como medida prognóstica (ACOSTA et al, 2009; IVAN; PRIETO, 2011).

3.1.4.6 Taxa mitótica

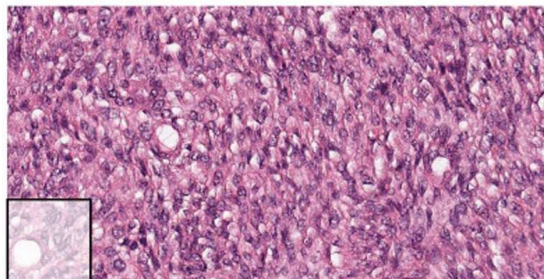
A taxa mitótica é um determinante importante de prognóstico, embora não esteja sendo mais usada como critério para definir estadiamento. A contagem é

expressa como mitoses/mm² (AMIN et al, 2017). Foi descrito maior número de mitoses em melanomas amelanóticos, independente da espessura, sugerindo que estes podem crescer mais rapidamente que os melanomas pigmentados (THOMAS et al, 2014).

3.1.4.7 Pigmentação

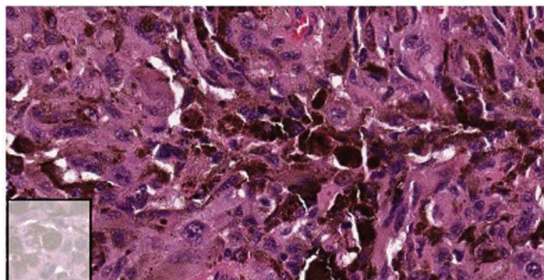
A melanina, principal pigmento relacionado à cor da pele, pode ser analisada em cortes histológicos de melanoma, de forma semi-quantitativa, pela coloração de hematoxilina-eosina (MIOT et al, 2012). Em análises histopatológicas, os melanomas são considerados amelanóticos quando não são vistos grânulos de melanina no citoplasma das células tumorais (THOMAS et al, 2014). A figura 8 mostra imagens de melanoma pigmentado e de melanoma amelanótico, observados na coloração de hematoxilina e eosina.

(A) amelanotic melanoma



35 μm

(B) pigmented melanoma



35 μm

Figura 8. A) Melanoma amelanótico mostrando ausência de grânulos de melanina de coloração acastanhada no citoplasma das células neoplásicas. B) Melanoma melanótico mostrando a presença de grânulos de melanina de coloração acastanhada no citoplasma das células neoplásicas. Fonte: DOBLE, 2018.

3.1.4.8 Marcadores moleculares

O exame de imuno-histoquímica (IHQ) é utilizado para ajudar a elucidar casos duvidosos de lesões melanocíticas. Embora este exame não seja necessário para a maioria dos melanomas, em alguns casos, por exemplo os desmoplásicos e amelanóticos, pode ser fundamental para a conclusão diagnóstica (ABBAS et al, 2014).

Dentre os marcadores mais utilizados para o diagnóstico, estão o anti-S100 (proteína S100), anti-Melan A, anti-SOX10 (Gene 10 de HMG-Box relacionado a Sry) anti-HMB45 (anti-Melanossomo humano) e anti-MITF (LUCA, 2018). Ainda, o Ki-67 é útil para avaliar o índice proliferativo e ajudar a diferenciar nevos de melanomas. A proteína p16, produto do gene inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (*CDKN2A*), mostra diminuição da coloração nuclear dentro dos melanomas em comparação com nevos. Acredita-se que sua perda contribua para a desregulação do ciclo celular na progressão do melanoma (ABBAS et al, 2014).

Estudos genéticos, que podem contribuir para a escolha terapêutica, demonstram que padrões distintos de alterações cromossômicas são identificados em pele exposta cronicamente ao sol, em peles com exposição intermitente ao sol e nos melanomas acrais ou de mucosas (IVAN; PRIETO, 2011).

A mutação em quinase tipo B do fibrossarcoma rapidamente acelerado (*BRAF*) pV600E é a alteração oncogênica mais frequentemente encontrada nos melanomas da pele com baixo grau de dano solar cumulativo, enquanto a mutação do gene da neurofibromatose tipo 1 (*NF1*), o homólogo do oncogene viral RAS do neuroblastoma (*NRAS*) e outras mutações *BRAF*, não pV600E, e talvez as mutações do gene da proteína tirosina-quinase (*KIT*), predominam nos melanomas de pele com alto grau de dano solar cumulativo. O promotor da transcriptase reversa da telomerase (*TERT*) é geralmente mutado em melanomas em estágio inicial de evolução (WHO, 2018).

3.1.4.9 Estadiamento tumoral

O diagnóstico histológico do melanoma é seguido pela avaliação de doença regional e sistêmica usando critérios clínico-patológicos definidos pela classificação TNM (ABBAS et al, 2014). Esta classificação constitui a pedra angular para o estadiamento dos cânceres, incluindo os melanomas (AMIN et al, 2017, SANTOS et al, 2019a).

Os dados usados para estabelecer as categorias TNM foram baseados principalmente em melanomas de disseminação superficial e subtipos nodulares. No entanto, no momento, os mesmos critérios de estadiamento devem ser usados para melanomas com qualquer padrão histológico (AMIN et al, 2017).

As figuras 9, 10, 11 e 12 apresentam os critérios para definir o TNM e estadiamento, conforme a AJCC.

Tumor primário (T)	
pTx	Espessura tumoral não avaliável
pT0	Sem evidência de tumor primário
pTis	Melanoma <i>in situ</i>
pT1	≤ 1 mm de espessura
pT1a	< 0,8 mm sem ulceração
pT1b	< 0,8 mm com ulceração 0,8-1,0 mm com ou sem ulceração
pT2	> 1,0-2,0 mm de espessura
pT2a	> 1,0-2,0 mm sem ulceração
pT2b	> 1,0-2,0 mm com ulceração
pT3	> 2,0-4,0 mm de espessura
pT3a	> 2,0-4,0 mm sem ulceração
pT3b	> 2,0-4,0 mm com ulceração
pT4	> 4,0 mm de espessura
pT4a	> 4,0 mm sem ulceração
pT4b	> 4,0 mm com ulceração

Figura 9. Classificação do tumor primário melanoma, conforme a AJCC, 8ª Edição. Fonte: SANTOS et al, 2019a.

Linfonodos regionais (N)	
Nx	Linfonodos regionais não avaliados
N0	Sem evidência de metástase linfonodal
N1	
N1a	1 linfonodo envolvido (sentinela) e ausência de satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose.
N1b	1 linfonodo envolvido e ausência de satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose.
N1c	Presença de satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose, sem envolvimento linfonodal.
N2	2 a 3 linfonodos envolvidos, ou 1 linfonodo envolvido em associação a satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose.
N2a	2 ou 3 linfonodos envolvidos (sentinela) e ausência de satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose.
N2b	2 ou 3 linfonodos envolvidos e ausência de satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose.
N2c	1 linfonodo envolvido (sentinela ou não) em associação a satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose.
N3	4 ou mais linfonodos envolvidos, ou 2-3 linfonodos envolvidos em associação a satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose.
N3a	4 ou mais linfonodos envolvidos (sentinela) e ausência de satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose.
N3b	4 ou mais linfonodos envolvidos ou linfonodos coalescentes e ausência de satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose.
N3c	Ao menos 2 ou 3 linfonodos envolvidos (ou coalescentes) em associação a satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose.

Figura 10. Classificação dos linfonodos regionais, conforme a AJCC, 8ª Edição. Fonte: SANTOS et al, 2019a.

Metástases a distância (M)	
M0	Ausência de metástases a distância.
M1	Presença de metástases a distância.
M1a	0 - Metástases em pele, partes moles, músculos ou linfonodos não regionais, e níveis séricos de DHL dentro da normalidade. 1 - Metástases em pele, partes moles, músculos ou linfonodos não regionais, e níveis séricos de DHL elevados.
M1b	0 - Metástases em pulmão (com ou sem sítios incluídos em M1a), e níveis séricos de DHL dentro da normalidade. 1 - Metástases em pulmão (com ou sem sítios incluídos em M1a), e níveis séricos de DHL elevados.
M1c	0 - Metástases para sítios além de M1a e M1b, sem comprometimento do SNC, e níveis séricos de DHL dentro da normalidade. 1 - Metástases para sítios além de M1a e M1b, sem comprometimento do SNC, e níveis séricos de DHL elevados.
M1d	0 - Metástases para SNC e níveis séricos de DHL dentro da normalidade. 1 - Metástases para SNC e níveis séricos de DHL elevados.

Figura 11. Classificação da metástase a distância, conforme a AJCC, 8ª Edição. Fonte: SANTOS et al, 2019a.

Estadiamento Clínico				Estadiamento Patológico			
Estádio	T	N	M	Estádio	T	N	M
0	Tis	NO	M0	0	Tis	NO	M0
IA	T1a	NO	M0	IA	T1a	NO	M0
IB	T1b/T2a	NO	M0	IB	T1b/T2a	NO	M0
IIA	T2b/T3a	NO	M0	IIA	T2b/T3a	NO	M0
IIB	T3b/T4a	NO	M0	IIB	T3b/T4a	NO	M0
IIC	T4b	NO	M0	IIC	T4b	NO	M0
III	Qualquer	≥N1	M0	IIIA	T1a/T1b/T2a	N1a/N2a	M0
IV	Qualquer	Qualquer	M1	IIIB	T0 T1a/T1b/T2a	N1b/N1c N1b/N1c/N2b N1a a N2b	M0
				IIIC	T0 T1a a T3a T3b/T4a T4b	N2b/N2c/N3b/N3c N2c ou N3 Qualquer N pos N1a a N2c	M0
				IIID	T4b	N3 (a,b,c)	M0
				IV	Qualquer	Qualquer	M1

Figura 12. Estadiamentos clínico e patológicos, conforme AJCC, 8ª Edição. Fonte: SANTOS et al, 2019a.

3.1.4.10 Sobrevida

Quando o melanoma é diagnosticado e tratado em suas fases iniciais, a taxa de sobrevida em 5 anos é de mais de 90% e parece satisfatória quando comparada com o câncer de pulmão, que pode ser em torno de 20%. No entanto, se o diagnóstico do melanoma for tardio, a sobrevida em 5 anos é inferior a 20% (TOD et al, 2019; PAN et al, 2020).

Cerca de 90% dos melanomas são diagnosticados como tumores primários sem qualquer evidência de metástase. A sobrevida específica em 10 anos para esses tumores é de 75 a 95%. Para os pacientes que apresentam metástase satélite e em trânsito é de 30 a 50%, para os com micrometástases linfonodais é de 69 a 75% e para os com metástases linfonodais regionais clinicamente aparentes é de 40 a 60%. O prognóstico é sombrio com para os pacientes com metástase à distância, com sobrevida de 6 a 9 meses (GARBE et al, 2020a).

3.2. MELANOGÊNESE

3.2.1 Conceito

Melanogênese é o processo de síntese da melanina que ocorre nos melanócitos. A melanina tem um papel importante na homeostase da pele através da fotoproteção contra o efeito nocivo da radiação UV (MARANDUCA et al, 2019). As propriedades de fotoproteção da melanina, na pele humana, ocorrem pela absorção e dispersão, tanto da luz UV quanto da luz visível (MIOT et al, 2009).

A melanina é produzida nos melanócitos, que são células dendríticas, neuroectodérmicas, que derivam dos melanoblastos da crista neural (MARANDUCA et al, 2019). Os melanossomas são organelas celulares (LIU-SMITH et al, 2015) semelhantes aos lisossomas, nas quais os pigmentos de melanina são sintetizados e armazenados antes da distribuição para os ceratinócitos (D'MELLO et al, 2016). A figura 13 ilustra a disposição dos melanócitos em relação aos ceratinócitos.

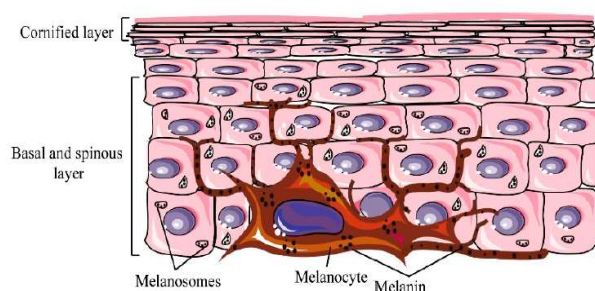


Figura 13. Melanócitos localizados na camada basal da epiderme transferem a melanina para os ceratinócitos. FONTE: D'MELLO et al, 2016

Estudos ultraestruturais revelaram que os melanossomas, na pele negra, permanecem intactos na epiderme, após exposição à radiação UV, enquanto na pele clara, nenhum melanossoma permanece intacto (MIOT et al, 2009).

A cor da pele é determinada pelos pigmentos melânicos, e mais precisamente pela relação entre os dois tipos de pigmento - eumelanina e feomelanina, que são produtos finais de reações bioquímicas complexas (MARANDUCA et al, 2019). Se a quantidade de feomelanina produzida pelos melanócitos epidérmicos for maior que a de eumelanina, a pele fica mais clara e tem uma maior susceptibilidade às queimaduras solares (LIU-SMITH et al, 2015).

3.2.2 Biossíntese da melanina

A produção de melanina é iniciada e regulada por uma série de sistemas de sinalização e fatores de transcrição (D'MELLO et al, 2016). A melanina é formada por meio de reações químicas enzimáticas denominadas via Raper-Mason (MARANDUCA et al, 2019).

Os tipos e quantidades de melanina produzidos pelos melanócitos são determinados geneticamente e são influenciados por uma variedade de fatores extrínsecos e intrínsecos, como alterações hormonais, inflamação, idade e exposição à luz UV (D'MELLO et al, 2016).

O elemento inicial para a síntese da melanina é a tirosina, um aminoácido essencial (MIOT et al, 2009). A hidroxilação da L- tirosina para L-DOPA é catalisada pela tirosinase (TYR) e por proteínas relacionadas à tirosinase (Tyrop 1 – tirosinase relacionada à proteína 1 e Dct – dopacromotautomerase). A feomelanina resulta da polimerização oxidativa da cisteinildopa e a eumelanina da polimerização oxidativa da dihidroxiindol (Figura 14) (MARANDUCA et al, 2019).

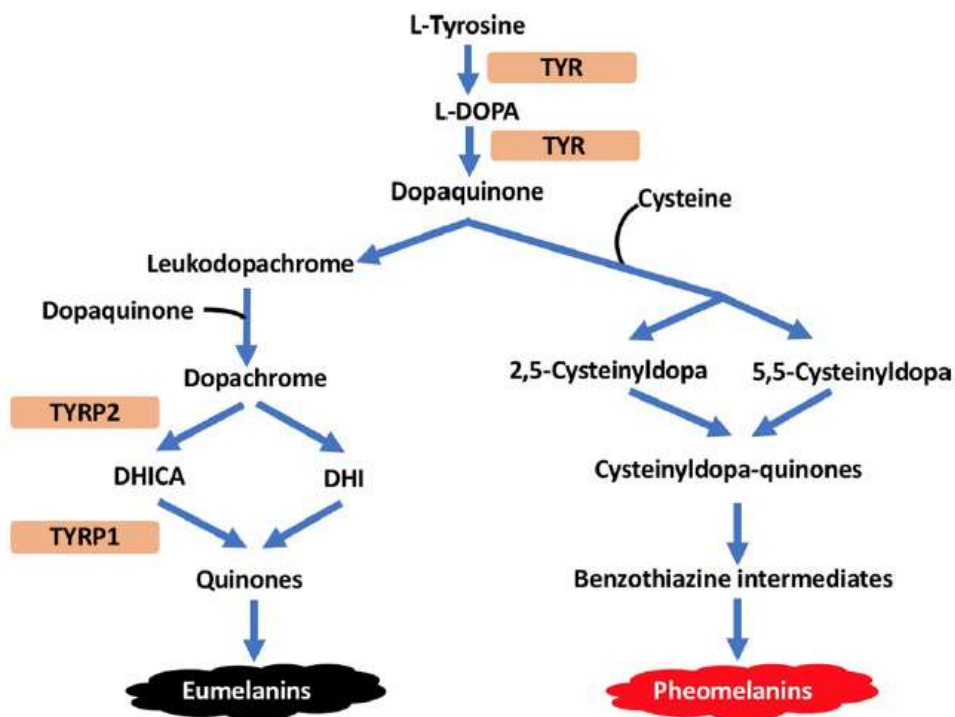


Figura 14. Via bioquímica da formação de eumelanina e feomelanina. Fonte: NGUYEN; FISHER, 2010.

A pele que contém mais feomelanina também produz mais espécies reativas de oxigênio que podem acelerar a carcinogênese (JU et al, 2019; MARANDUCA et al, 2019), em comparação com a pele que produz eumelanina ou que não possui melanina. Após a exposição à radiação UV, a melanina pode agir como fotossensibilizador para gerar radicais superóxidos que causam lesão celular (D'MELLO et al, 2016). Portanto, a melanina pode contribuir para danos adicionais ao DNA e levar ao aumento do risco de câncer de pele.

3.2.3 Genética da melanogênese

A pigmentação melânica está sob controle genético regulado por mais de 150 alelos espalhados por 90 *loci* (SLOMINSKI et al, 2004), incluindo *MITF*, *MC1R* (MIOT et al, 2009, D'MELLO et al, 2016). A figura 15 mostra um resumo da via de ativação da melanogênese, através da radiação UV.

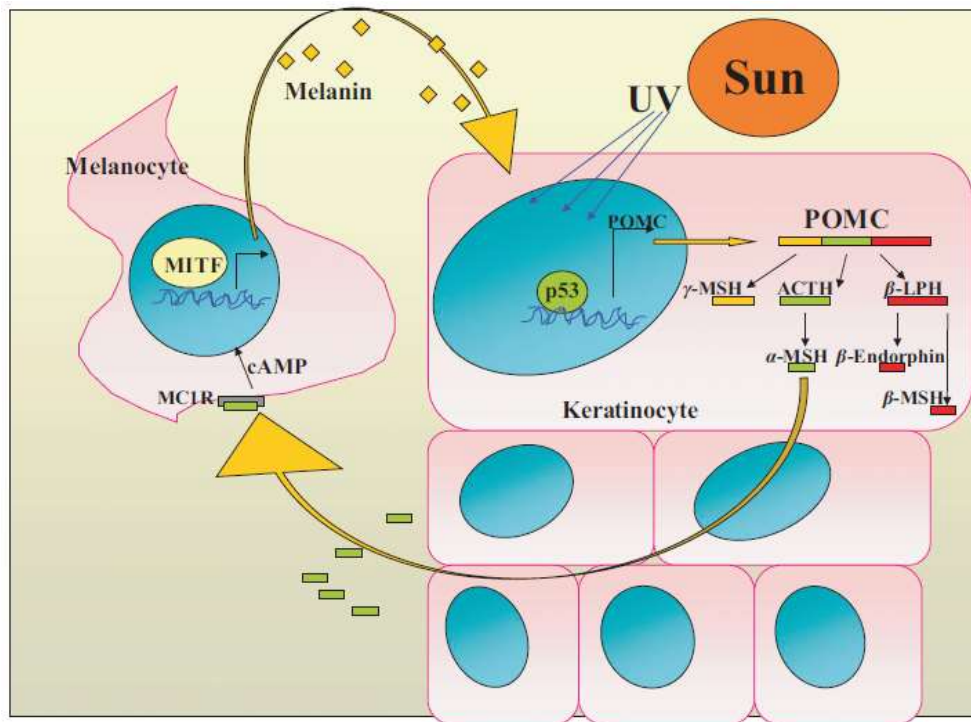


Figura 15. Via de pigmentação através da ação da radiação UV sobre o DNA, que resulta na ativação dos fatores MCL1 e MITF. Fonte: LIU; FISHER, 2010

A pigmentação pode servir como um indicador de alterações genéticas e metabólicas e é determinada pela atividade da tirosinase (TYR), que está relacionada à ação de oncogenes com impacto na atividade de *MITF* (HALABAN, 2002). O *MITF* que está envolvido no processo de pigmentação e sobrevivência de linhagem celular desempenha papéis importantes, tanto no melanócito normal quanto na célula de melanoma (HSIAO; FISHER, 2014).

A relação entre melanina e geração de melanoma não é intuitiva, uma vez que o conhecimento estabelecido sobre a melanina é, em geral, de efeito protetor (LIU-SMITH et al, 2015).

3.2.4 Melanomas melanóticos e amelanóticos

Assim como a relação entre a pigmentação e a gênese do melanoma não está bem elucidada, os estudos sobre a relação entre pigmentação e prognóstico parecem ser controversos. Em 1969, COCHRAN, estudou a pigmentação em um

grupo de melanomas. Dentre 136 tumores, 75 (55%) tinham pigmentação discreta ou ausente, 32 (24%) moderada e 29 (21%) acentuada. Neste grupo, não foram identificadas variações significativas na sobrevida ou padrão metastático (COCHRAN, 1969). Larsen e Grude, em 1978, estudou 669 melanomas e encontrou, em tumores com invasão até a interface entre derme papilar e reticular, ausência de relação significativa entre infiltrado linfocitário, pigmentação, atipia celular, atividade mitótica, tipo histológico e ulceração. (LARSEN; GRUDE, 1978).

Em 1983, Maize, relatou que a resposta inflamatória e a pigmentação, dentre outros fatores, não são indicadores independentes de prognóstico e estas se correlacionam com a espessura do tumor. Em 1978, Balch et al encontraram na sua amostra, 18% de melanomas despigmentados, mais frequentes em lesões espessas, com taxa de sobrevida em 5 anos de 36% para os melanomas sem pigmentação e 69% com pigmentação ($p=0,006$) (BALCH et al, 1978).

O melanoma amelanótico é um subtipo menos comum de melanoma com pouco ou nenhum pigmento clinicamente visível. Corresponde de 2 a 8% de todos os melanomas (GHIORZO et al, 2009). Apesar da classificação fenotípica como amelanóticos, eles apresentam algum pigmento de melanina, predominantemente a feomelanina (LIU-SMITH et al, 2015).

A sobrevida nos casos de melanomas amelanóticos é significativamente pior em comparação com os melanóticos. Existe a hipótese de que os antígenos presentes neste melanoma poderiam resultar em uma resposta imunológica reduzida e, como consequência, em um pior prognóstico (MOREAU et al, 2013). Alguns estudos concluem que os melanomas amelanóticos têm pior prognóstico porque são diagnosticados em estágios mais avançados devido à dificuldade diagnóstica na clínica. No entanto, a presença de mitoses, independente da espessura Breslow, sugere que o melanoma amelanótico tenha propensão a crescer mais rapidamente do que o pigmentado. (THOMAS et al, 2014).

Nos melanomas da íris, a menor quantidade de pigmento é associada ao maior risco de recorrência, metástase e morte pelo melanoma, mesmo após ajuste com outros parâmetros clínicos (BROUWER et al, 2018).

O efeito da presença de melanina sobre a capacidade das células do melanoma de metastatizar permanece desconhecido. É aceito que durante a síntese de melanina as células do melanoma são menos agressivas. Portanto, pode haver o envolvimento nesta fase de genes que suprimem a invasão. No entanto, o que acontece depois que o pigmento é produzido permanece controverso (SARNA et al, 2019).

Estudos demonstram que a presença de melanina modifica as propriedades físicas nanomecânicas das células de melanoma (SARNA et al, 2019). A melanina está dentro dos melanossomas e estes possuem propriedades mecânicas incomuns, sendo muito rígidos e difíceis de deformar (SARNA et al, 2018). As células que possuem mais melanina provavelmente têm menor potencial de invasão e metástase porque os grânulos inibem a transmigração de células (SARNA et al, 2014).

A melanogênese pode afetar a história natural do melanoma e o resultado da terapia (PICARDO et al, 2017). A pigmentação da melanina é um marcador importante que poderia representar uma parte do laudo anatomopatológico dos melanomas. Tal informação indicaria a presença de proteínas relacionadas à melanogênese como um alvo para imunoterapia (SLOMINSKI et al, 2014 b).

3.3 *STAT6* E *MITF*

O transdutor de sinal e ativador de proteínas de transcrição 6 (*STAT6*) e o fator de transcrição de microftalmia (*MITF*) (NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2020) são componentes celulares que controlam a expressão gênica. Estes fatores de transcrição determinam como as células funcionam e respondem aos ambientes celulares (VAQUERIZAS et al, 2009).

3.3.1 *STAT6*

O gene *STAT6*, membro da família *STAT* de fatores de transcrição, codifica a proteína *STAT6*, que desempenha um papel central nas respostas biológicas mediadas por interleucina 4 (IL-4) (NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2020). A IL-4 é uma citocina produzida principalmente por linfócitos T CD4+ e está associada à diminuição da tumorigenicidade pela ativação da resposta imune (LEE et al, 2016).

A via do Janus quinase (*JAK*) e *STAT* está envolvida na imunidade, divisão e morte celular, bem como na formação de tumores (OWEN et al, 2019). A sinalização *JAK2-STAT6*, induzida por IL-4, é considerada um dos mecanismos envolvidos na hipopigmentação das doenças cutâneas (CHOI et al, 2013).

A cascata de sinalização da via *JAK-STAT* é iniciada pelo engajamento de receptores de citocinas, resultando na fosforilação e posterior ativação do *JAK*. Após ativado, o *JAK* medeia a fosforilação de tirosina. A proteína *STAT* reconhece esses locais fosforilados, é ativada e então se dissocia, sofre dimerização no citoplasma e, finalmente, transloca para o núcleo onde atua como fator de transcrição (SON et al, 2017). A figura 16 ilustra a ligação de citocina ao receptor de *JAK* e posterior fosforilação e ativação do *STAT*.

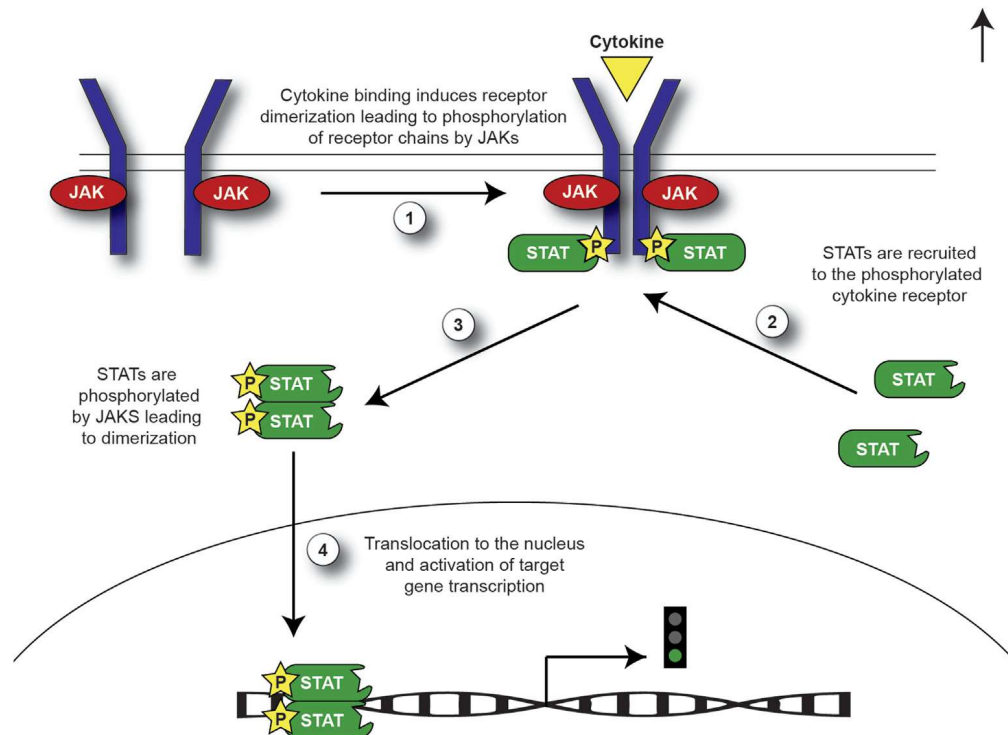


Figura 16. Citocina induz dimerização e fosforilação dos receptores de *JAK*, que fosforila e ativa o *STAT* para posterior translocação para o núcleo. Fonte: DAMSKY; KING, 2017.

A expressão de genes chave na via de sinalização *JAK-STAT* em vários tipos de câncer desempenha papéis diferentes. Os resultados de um estudo sugerem que

a expressão de genes *STAT*, incluindo do *STAT6*, pode ser usada como um potencial biomarcador prognóstico de melanoma cutâneo (PAN et al, 2020).

Lee *et al.*, em 2016, encontraram que a superexpressão de IL-4 suprime o desenvolvimento do melanoma através da ativação da via do *STAT6* (LEE et al, 2016). Outro estudo investigou se uma resposta alérgica em camundongos poderia potencializar um efeito inibitório do crescimento do melanoma pelo aumento da IL-4 e ativação das vias *STAT6*, tendo encontrado que a sinalização da IL-4 é uma via potencialmente importante na supressão do desenvolvimento do melanoma (SON et al, 2017).

Estudos referem que fatores ambientais como radiação UV, poluentes e produtos químicos são estímulos para produção de fatores inflamatórios que estão envolvidos na melanogênese. As IL-4 e IL13 inibem a melanogênese em melanócitos normais por diminuir a expressão de MITF, TYRP1 e TYRP2 através da via JAK-STAT6 (Figura 17) (HOSSAIN et al, 2021)

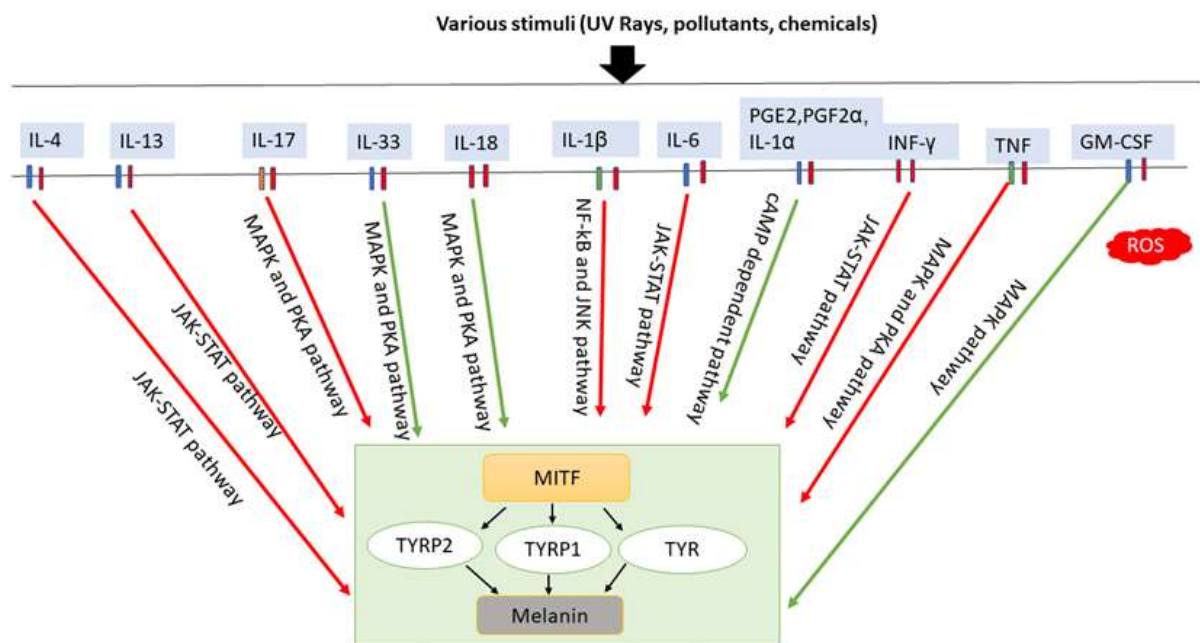


Figura 17. Estímulos ambientais produzem fatores inflamatórios envolvidos na melanogênese. Fonte: HOSSAIN et al, 2021.

3.3.2 MITF

O *MITF* é um gene essencial para o desenvolvimento dos melanócitos que, além de controlar a diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (SWOBODA et al, 2018, VACHTENHEIM, 2017) é um elemento regulador de expressão de enzimas e proteínas estruturais envolvidas na produção de melanina (LIU; FISHER, 2010). Devido ao seu papel dominante, foi denominado de "mestre regulador transcricional da linhagem de melanócitos" (KAWAKAMI; FISHER, 2017). A figura 18 mostra os alvos do *MITF*.

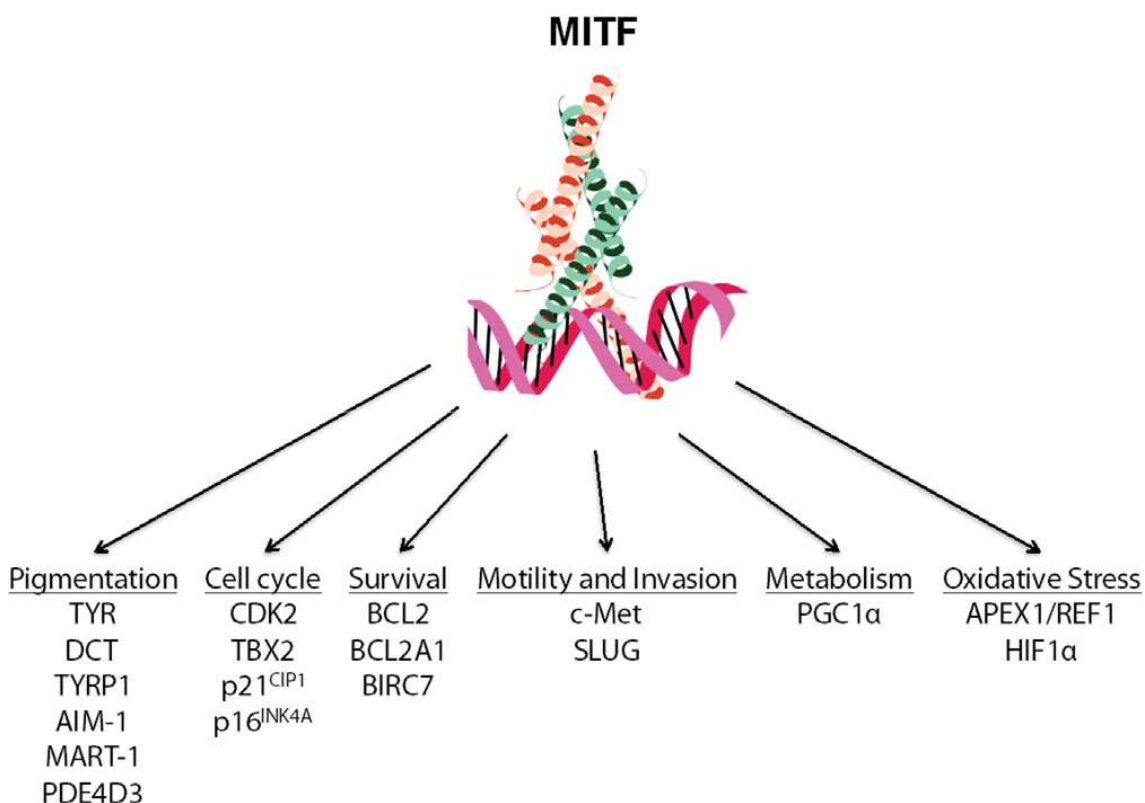


Figura 18. MITF é o regulador mestre de muitos alvos que são relevantes para os melanócitos normais e para os melanomas. Fonte: HSIAO; FISHER, 2014.

A superexpressão de MITF tem sido demonstrada em melanomas cutâneos. Mutações somáticas foram encontradas em melanomas metastáticos e a amplificação do gene *MITF* tem sido observada em cerca de 30% destes. Uma mutação germinativa foi encontrada em famílias em que vários membros tinham melanoma (GRILL et al, 2013). A maioria dos melanomas apresenta reatividade para MITF no exame de imuno-histoquímica. No entanto, uma grande proporção de

melanomas desmoplásicos e de células fusiformes não demonstra essa expressão (FERRINGER et al, 2015).

O mecanismo subjacente pelo qual os níveis de MITF são mantidos não é totalmente compreendido (ELIADES et al, 2018). Sabe-se que sua expressão é regulada pelo microambiente tumoral e que a IL-4 inibe diretamente a melanogênese em melanócitos normais e regula negativamente a transcrição e a tradução de genes associados à melanogênese (CHOI et al, 2013). Acredita-se que a troca intercelular de micro ácidos ribonucleicos (microRNAs) pode regular negativamente a transcrição de *MITF*, via exossomos (HARTMAN; CZYZ, 2014).

O *MITF* pode ser expresso em níveis diferentes em subpopulações distintas de melanomas (HARTMAN; CZYZ, 2014). A alta expressão de *MITF* está associada a células de melanoma com fenótipo proliferativo, mas não invasivo. Em contraste, as células de melanoma com baixa expressão de *MITF* representam aumento na capacidade de invasão e metástase (SWOBODA et al, 2018; VACHTENHEIM, 2017).

3.4 TERAPÊUTICA

O tratamento dos melanomas, nos estágios iniciais, é a excisão da lesão com margens de segurança (DAVIS et al, 2019). A dissecação do linfonodo sentinela deve ser realizada como procedimento de estadiamento em pacientes com tumor de 1,0 mm ou mais de espessura, ou de 0,8 mm com fatores de risco histológicos (GARBE et al, 2020b).

Opções terapêuticas medicamentosas desenvolvidas nos últimos 10 anos melhoraram o prognóstico de pacientes com metástase de melanoma. No entanto, a maioria destes pacientes não mostra uma resposta duradoura a esses tratamentos (DAVIS et al, 2019). Terapias adjuvantes são principalmente anti-proteína de morte celular programada 1 (anti-PD-1), independente do estado mutacional, ou dabrafenibe mais trametinibe para pacientes mutantes *BRAF* (GARBE et al, 2020b).

Em metástases à distância, ressecadas ou não, o tratamento sistêmico é indicado. Para tratamento de primeira linha, particularmente em pacientes com BRAF do tipo selvagem, a imunoterapia com anticorpos PD-1 isoladamente ou em combinação com os anticorpos do antígeno-4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4) deve ser considerada. Em pacientes com estágio IV e uma mutação *BRAF-V600E/K*, terapia de primeira linha com inibidores *BRAF* e MAP quinase-ERK quinase (*MEK*) pode ser oferecida como uma alternativa à imunoterapia (GARBE et al, 2020b).

A terapia sistêmica para os melanomas de estágio III/IV está em um cenário de rápida mudança e é provável que essas recomendações possam mudar em um futuro breve (GARBE et al, 2020b). Novos biomarcadores e terapias alvo são necessárias para melhorar a precisão do diagnóstico e tratamento do melanoma (DAVIS et al, 2019).

Estudos sugerem que a pigmentação e a imunidade podem estar funcionalmente ligadas (CARPENTIER et al, 2017). Dentre as perspectivas de tratamento para o câncer, está a participação da melanina em uma estratégia de imunoterapia. A melanina em combinação com a radiação infravermelha aumenta a geração de calor, o que promove mais captação do antígeno tumoral pelas células dendríticas, aumenta a infiltração de células T e a liberação local de citocinas com aumento das respostas imunes antitumorais (YE et al, 2017).

Uma imunoglobulina (IgG8C3) radiomarcada contra melanina indicou efeito em melanoma com segurança em relação a tecidos saudáveis contendo melanina. Os dados *in vivo* apoiam o desenvolvimento de IgG8C3 como reagente de radioimunoterapia para melanoma metastático (NOSANCHUK et al, 2018). Outro estudo com radioimunoterapia, com IgG, teve como alvo a melanina "livre" no microambiente tumoral, com pouca ou nenhuma absorção em tecidos naturalmente melanizados. Portanto, o anticorpo IgG para melanina é um agente promissor para melanoma metastático (ALLEN et al, 2019).

A melanogênese desregulada pode estar envolvida na gênese, progressão e resistência à terapia do melanoma (WASIEWICZ et al, 2015). Para Brożyna et al, a melanogênese pode afetar as respostas imunológicas, de quimioterapia e radioterapia para melanoma e a inibição da melanogênese poderia ser uma abordagem adjuvante racional para a terapia do melanoma metastático (BROŻYNA

et al, 2016). Um estudo sugeriu que a quantidade intracelular de melanina, principalmente a eumelanina, está inversamente relacionada à radiosensibilidade (KINNAERT et al, 2000).

Investigações sobre formas de terapias adjuvantes, como terapia fotodinâmica, podem contribuir para os avanços no tratamento do melanoma. Um estudo propôs que a despigmentação, ou seja, a remoção da melanina, em células de melanoma melanótico aumentaria sua suscetibilidade à morte celular induzida por terapia fotodinâmica e sugeriu que este pigmento pode ser um dos responsáveis pela quimiorresistência nos melanomas (SHARMA; DAVIDS, 2011). A terapia adjuvante com análogos de vitamina D demonstra atividade antimelanoma. No entanto, a melanogênese parece interferir negativamente na atividade destes análogos (WASIEWICZ et al, 2015).

A regulação da pigmentação pelo *MITF* e por outros antígenos relacionados à imunidade tumoral levanta a questão se o *MITF* pode efetivamente afetar uma resposta imune contra o melanoma (KAWAKAMI; FISHER, 2017). A redução da atividade de *MITF* pode sensibilizar as células de melanoma para quimioterápicos e, portanto, alterações que afetam este gene podem ser benéficas para pacientes com melanoma (HARTMAN; CZYZ, 2014).

Novas drogas alvo estão mudando a terapia dermatológica. A via JAK/STAT é conhecida por estar envolvida em processos inflamatórios e neoplásicos das doenças de pele, como psoríase, dermatite atópica, alopecia areata, vitiligo e melanoma (GÓMEZ-GARCÍA, et al 2019, 2019). Evidências sugerem que inibidores de JAK podem constituir em uma alternativa terapêutica em dermatologia (DAMSKY; KING, 2017).

4. METODOLOGIA

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

4.1.1 Tipo de estudo

Estudo transversal, retrospectivo, para análise da pigmentação de melanomas e da associação com a expressão de STAT6 e MITF, critérios histológicos e sobrevida global.

4.1.2 Local de 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 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 é proveniente da rede pública de saúde. Devido a sua abrangência de atendimento, o CEDAP constitui um local apropriado para estudos de melanomas que são prevalentes na região de Joinville.

4.1.3 Período do estudo

O estudo foi realizado em amostras de melanomas primários diagnosticados no período de 2011 a 2015 e suas correspondentes metástases diagnosticadas entre 2011 e 2020. As análises das informações coletadas no banco de dados e as

análises histológicas e imuno-histoquímicas foram realizadas no período de janeiro de 2020 a junho de 2021.

4.1.4 Amostras e critérios de inclusão

Foram selecionadas amostras de melanomas a partir dos diagnósticos registrados no banco de dados do CEDAP. Foram incluídos melanomas primários e suas metástases de pacientes com acompanhamento na rede pública municipal de saúde. Não foram incluídas as amostras de ampliação de margem cirúrgica. Todos tinham indicação clínica para a realização do procedimento. Foram selecionadas 235 amostras e destas foram incluídas no estudo 201 amostras de melanomas primários e 28 de melanomas metastáticos, todos com melanoma primário correlato. Foram excluídos 4 casos de melanomas metastáticos por se tratar de micrometástase e 2 casos de melanomas primários, sendo um devido à retirada do bloco de parafina do laboratório pelo paciente e outro em razão da qualidade da lâmina ter ficado prejudicada após recoloração.

4.1.5 Procedimentos metodológicos

4.1.5.1 Banco de dados

No registro de laudos anatopatológicos do CEDAP foram obtidas as variáveis: diagnóstico de melanoma, procedência, gênero, idade, localização anatômica da lesão, tipo histológico, pT, metástase linfonodal e à distância. Com base nesses dados, o estadiamento anatomopatológico foi reclassificado conforme a 8ª edição da AJCC. Todos os diagnósticos tiveram acordo entre dois patologistas. As informações de sobrevida global em 5 anos foram obtidas no banco de dados do CEDAP e no Sistema Informações de Mortalidade – SIM, com acesso disponível na Vigilância Epidemiológica da Prefeitura Municipal de Joinville. (SIM; <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svs/sistemas-de-informacao/sistema-de->

informacoes-sobre-mortalidade-sim). A sobrevida global foi definida a partir do momento da data do diagnóstico inicial até a morte ou a data do último acompanhamento. Os óbitos por causas não melanoma foram excluídos da análise.

4.1.5.2 Análise histológica

As lâminas de histologia de todas as amostras foram recortadas pela técnica de hematoxilina e eosina (H&E) e as seguintes variáveis foram analisadas por dois observadores: linfócitos infiltrantes de tumor e elastose solar nos melanomas primários e grau pigmentação de melanina nos primários e metastáticos.

4.1.5.3 Análise imuno-histoquímica

Para a análise imuno-histoquímica da expressão proteica dos genes *MITF* e *STAT6*, foram selecionados os melanomas com espessura maior que 1,0 mm, correspondendo a 91 amostras.

Foram utilizadas amostras que estavam previamente fixadas em formalina a 10% e dispostas em blocos de parafina. Os blocos correspondentes as amostras a serem estudadas foram analisados macroscopicamente para a certificação que haveria quantidade de material suficiente para realização de outros testes, se necessários. Para controle positivo de *STAT6* foi utilizada amostra de tumor fibroso solitário e para *MITF* amostras de pele com melanócitos normais. O controle negativo foi realizado em ceratinócitos de peles normais.

Foram realizados cortes com espessura de 4 micrômetros e dispostos em lâminas histológicas silanizadas e deixadas “overnight” em estufa a 60°C. A recuperação antigênica foi feita no equipamento PT-Link (Dako, Glostrup, Dinamarca) em solução com pH 9,0 (“EnVision FLEX Target RetrievalSolution High pH (50x)”, Dako), durante 20 minutos a 95°C. A técnica de imuno-histoquímica foi realizada de forma automatizada com o equipamento “Autostainer Link 48” (Dako).

O anticorpo monoclonal anti-MITF de camundongo, clone C5D5 (Cell Marque™ Tissue Diagnostis, Darmstadt, Alemanha) foi utilizado em diluição 1:100. O anticorpo monoclonal anti-STAT6, de coelho, clone EP325 (Cell Marque™ Tissue Diagnosis, Darmstadt, Alemanha) também foi utilizado na diluição 1:100. A diluição utilizada foi determinada em testes em amostras prévias. A solução "EnVision FLEX HRP Magenta Substrate Chromogen System" (Dako) foi usada por 5 minutos para revelação. A solução "EnVision FLEX HRP Magenta Substrate Chromogen System"(Dako) foi usada por 5 minutos para revelação. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Gill.

4.1.5.4 Leitura e interpretação dos resultados

A elastose solar foi classificada nos grupos 0, 1, 2 e 3, conforme gradação presente na classificação *WHO – Classification of Skin Tumors* (WHO, 2018) (Figura 19). Os linfócitos infiltrantes de tumor foram classificados de acordo com o protocolo do colégio americano de patologia – CAP, em ausente, “nonbrisk” e “brisk” (Figura 20). A quantificação histológica da melanina foi baseada na gradação visual em negativa, discreta, moderada e acentuada, conforme descrito por Balch et al, em 1978 (Figura 21).

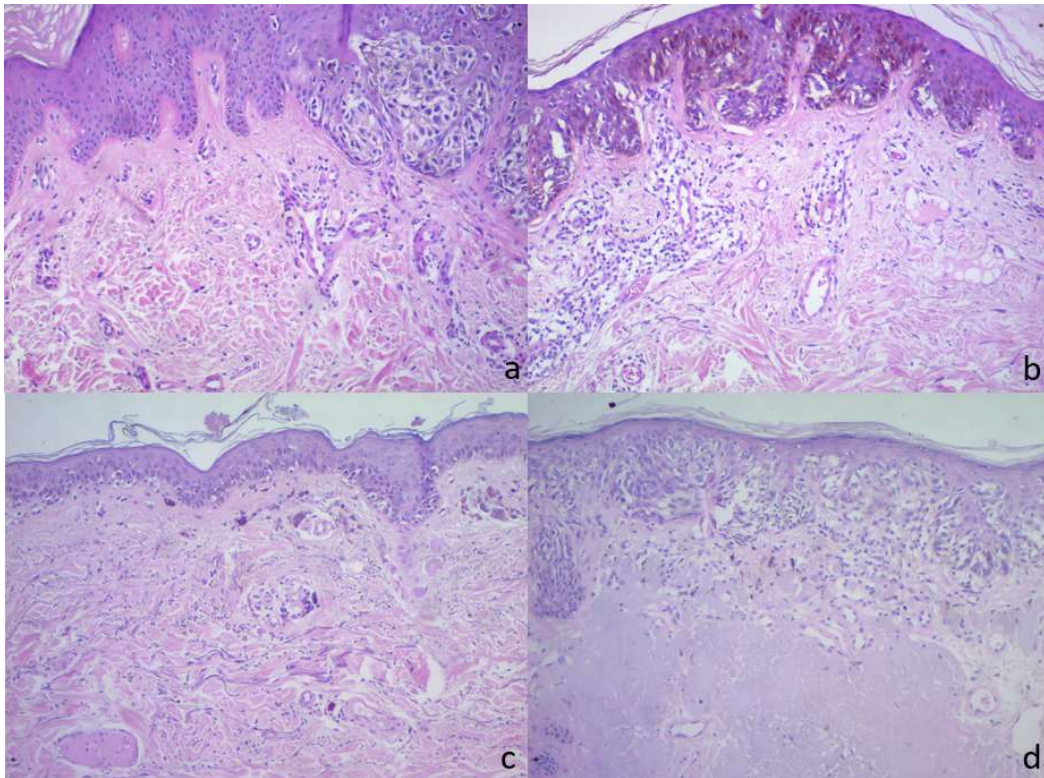


Figura 19. Imagens de amostras representativas da interpretação dos graus de elastose solar: a) 0 - ausência de elastose, b) 1- presença de elastose em fibras isoladas, c) 2 -elastose em grupos de fibras elásticas, d) 3 - presença de material basofílico com perda da textura fibrilar. Fonte: o Autor.

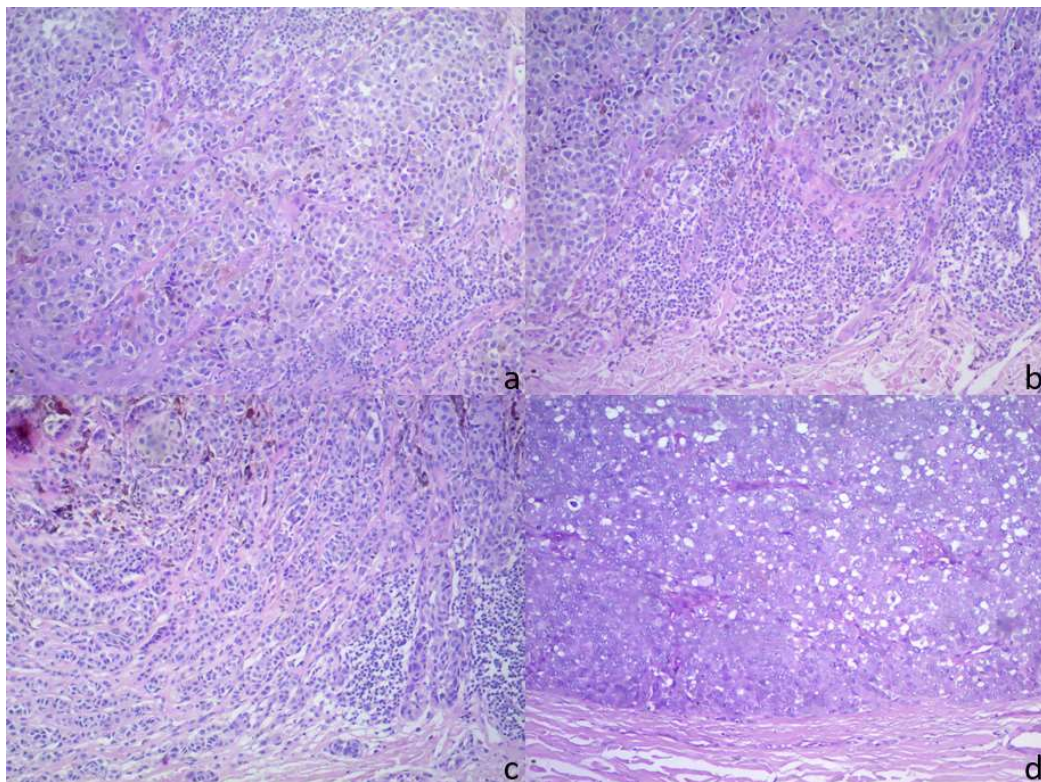


Figura 20. Imagens de amostras representativas da interpretação dos graus dos infiltrados linfocitários: a) e b), *brisk*; c) *nonbrisk*, d) ausente. Fonte: o Autor.

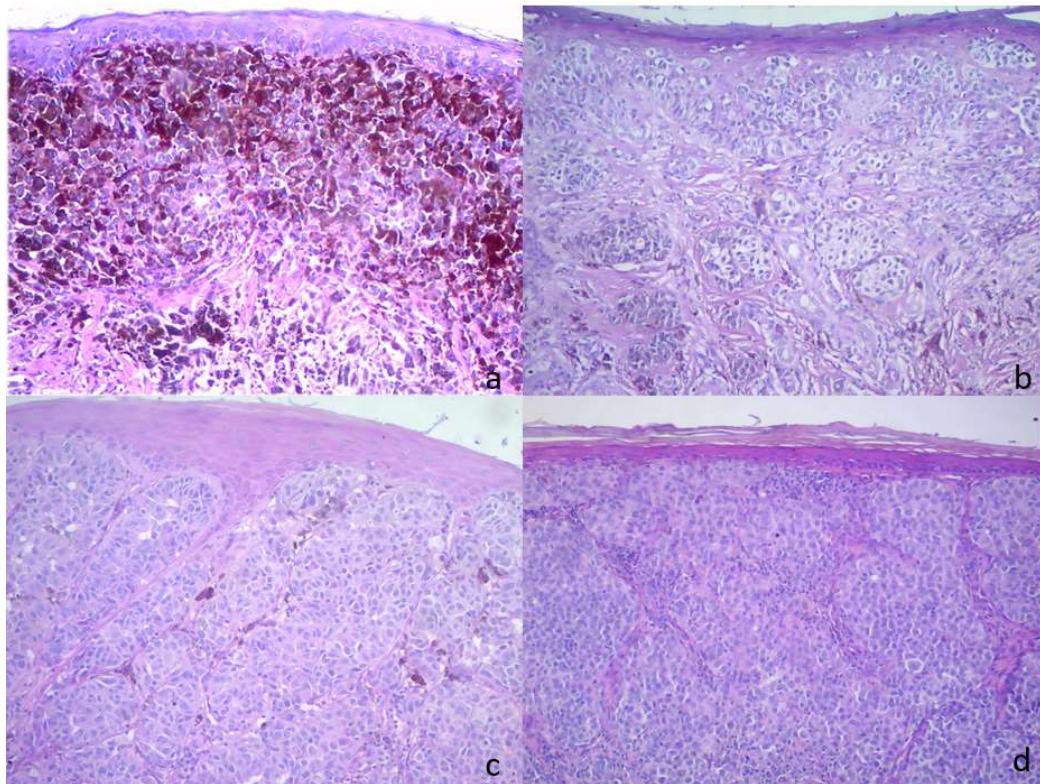


Figura 21. Imagens de amostras representativas da interpretação dos graus de pigmentação dos melanomas: a) acentuado b), moderado; c) discreto, d) ausente. Fonte: o Autor.

A expressão do gene *MITF* foi avaliada no núcleo (Figura 22) e do *STAT6* foi avaliada no citoplasma e núcleo (Figura 23). As lâminas de imuno-histoquímica foram analisadas por dois observadores experientes, de modo cego em relação aos dados clínicos dos pacientes. Foi estabelecido um H-Score via multiplicação de intensidade (0: sem coloração, 1: coloração fraca, 2: coloração moderada, 3: coloração forte) pela respectiva porcentagem de células coradas do tumor, com intervalos de 10%, resultando em valores entre 0 e 300. Amostras com um H-Score acima da mediana foram consideradas positivas (JURMEISTER et al, 2019).

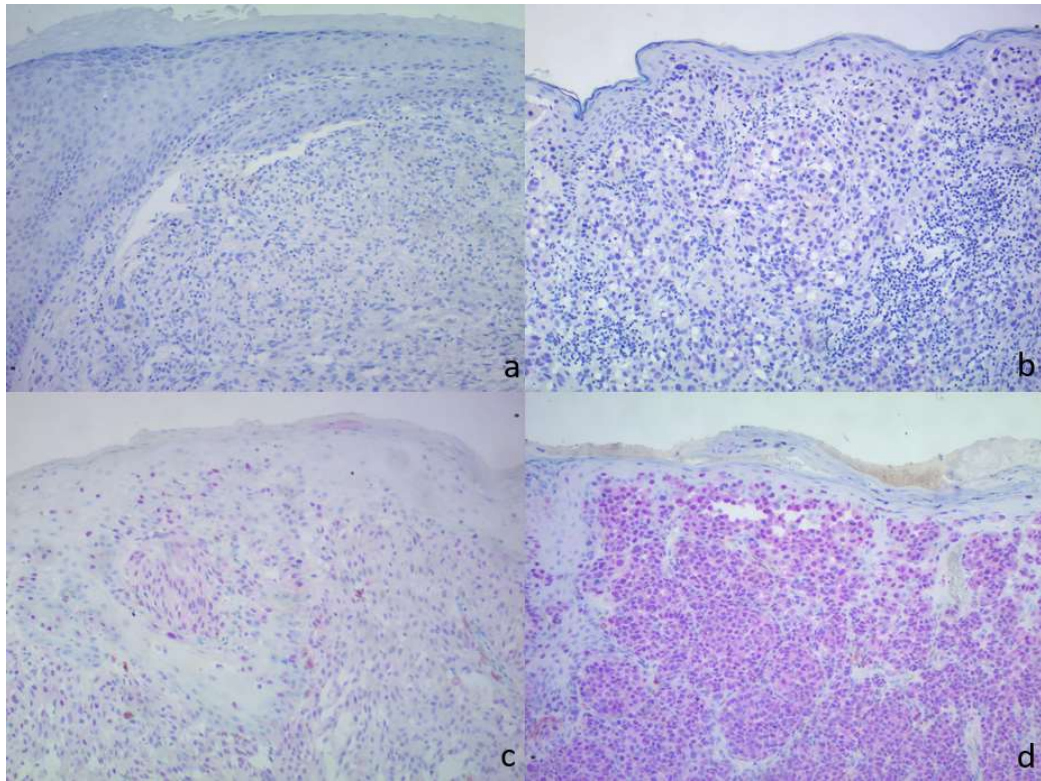


Figura 22. Imagens de melanomas primários com diferentes *scores* de expressão imunohistoquímica de MITF. a) *score* 0; b) *score* 80; c) *score* 160 d) *score* 300. Fonte: o Autor.

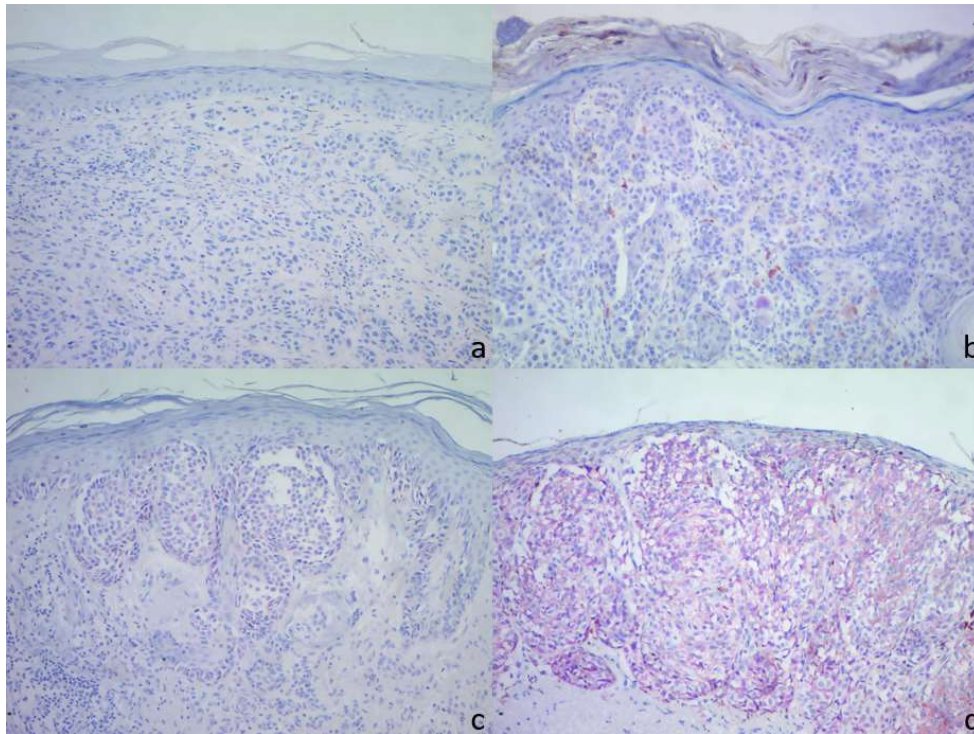


Figura 23. Imagens de melanomas primários com diferentes scores de expressão imunohistoquímica de STAT6. a) score 0; b) score 40; c) score 100 d) score 300. Fonte: o Autor.

4.1.6 Estatística

O nível de confiabilidade entre observadores foi determinado pelo teste de Kappa ponderado. O teste de qui-quadrado foi utilizado para avaliar a associação entre as variáveis categóricas. A análise de normalidade foi realizada com o teste de Shapiro-Wilk. O teste de U de Mann-Whitney de Kruskal-Wallis foram usados para comparações não paramétricas. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4.2 ANÁLISE *IN SILICO*

A análise *in silico* foi realizada a partir de conjunto de dados de melanomas disponíveis no portal “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga>). A expressão de mRNA do *STAT6* foi avaliada em relação à pigmentação por melanina de acordo com a disponibilidade no conjunto de dados (AKBANI, 2015). A expressão de mRNA foi normalizada na R2: Plataforma

de Análise e Visualização Genômica (<http://r2.amc.nl>) e apresentada em formato gráfico (boxplot) como log₂ transformado a partir da intensidade do sinal. Os subgrupos foram comparados usando o teste de Kruskal-Wallis pelo método ANOVA, seguido do pos-hoc teste de Tukey e mostrados como mediana e *whiskers* (min a máx). Diferenças significativas foram apresentadas como $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,0001$.

4.3 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 4.037.886. 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 Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, este capítulo será apresentado na forma de artigos científicos que foram submetidos à revista “Pathology, Research and Practice” (ISSN 0344-0338, Qualis B1 – Quadriênio 2013-2016 e Qualis A4 – Quadriênio 2017-2020, na área interdisciplinar).

APÊNDICE A - ARTIGO 1: **STAT6 EXPRESSION IS ASSOCIATED WITH THE DEGREE OF PIGMENTATION IN MELANOMAS**. Este artigo descreve a expressão de STAT6 em melanomas e a associação com a presença de pigmentação por melanina. Além disso, mostra a associação entre grau de pigmentação dos melanomas primários com o dos respectivos metastáticos e com critérios prognósticos e sobrevida global.

APÊNDICE B - ARTIGO 2: **THE EXPRESSION OF MITF IS ASSOCIATED WITH THE DEGREE OF PIGMENTATION AND THICKNESS OF MELANOMA**. Este artigo descreve a expressão de MITF na maioria dos melanomas e a sua associação com pigmentação e espessura.

APÊNDICE C - TABELA COM RESULTADOS: O apêndice C apresenta um link para acesso ao Google-Drive com tabelas, no formato excel, com os resultados deste estudo.

Outros artigos produzidos durante o doutorado em Saúde e Meio Ambiente com a orientação do Dr. Paulo Henrique Condeixa de França, estão citados abaixo.

1) **Coelho KMPA**, Bublitz GS, Condeixa de França PH, Stall J, Hanauer AD, Sanguenza JM. Epstein-Barr Virus-Positive Mucocutaneous Ulcer in a Pediatric Patient-Case Report. *Am J Dermatopathol.* 2020 Apr;42(4):e49-e52. doi: 10.1097/DAD.0000000000001568. PMID: 31764088.

2) Balsimelli LBS, Oliveira JC, Adorno FÁ, Brites CA, Bublitz GS, Tavares LCC, **Coelho KMPA**, Stall J, França PHC. Accuracy of Intraoperative Examination in Central Nervous System Lesions: A Study of 133 Cases. *Acta Cytol.* 2019;63(3):224-232. doi: 10.1159/000495175. PMID: 30982032.

3) Hugo M.; Jaqueline Stall; **Karina M. P. A. Coelho**; Viviane C. Silva; Paulo H. C. França. Evaluation of TP53 gene expression in patients with childhood cancer in northeastern Santa Catarina, Brazil. *J Bras Patol Med Lab.* 2022: 58. doi: 10.1900/JBPML.2022.58.448.

4) Adorno, Flora A.; Lousada, D. C. F.; **Coelho, K. M. P. A.**; França, P. H. C. The usefulness of high-risk HPV hybrid capture in patients with squamous cell atypia in cervical cytological examination. *J Bras Patol Med Lab.* 2020: 56. doi: 10.5935/1676-2444.20200006 .

5) Adorno, F.Á., **Coelho, K.M.**, Bublitz, G.S. et al. Leiomyoadenomatoid tumor of uterus: two case reports with literature review. *Surg Exp Pathol.* 2021: 4(5). <https://doi.org/10.1186/s42047-020-00086-9>.

Participação em artigo produzido durante o doutorado em Saúde e Meio Ambiente com a orientação da Dra. Selma Cristina Franco, docente deste programa.

1) Steglich RB, Cardoso S, Gaertner MHDCN, **Coelho KMPA**, Cestari TF, Franco SC. Differences in the diagnosis of primary cutaneous melanoma in the public and private healthcare systems in Joinville, Santa Catarina State, Brazil. *An Bras Dermatol.* 2018 Jul-Aug;93(4):507-512. doi: 10.1590/abd1806-4841.20185767.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que existe expressão imuno-histoquímica de STAT6 e de MITF, com *scores* variáveis, na maioria dos melanomas cutâneos primários. A expressão imuno-histoquímica tanto de STAT6 quanto de MITF se associa com a presença de pigmento de melanina e os maiores níveis de mRNA de *STAT6* com os maiores graus de pigmentação. A expressão imuno-histoquímica de MITF apresenta correlação com espessura e estadiamento tumoral. Conclui-se também que os melanomas menos pigmentados apresentam sobrevida global em 5 anos menor quando comparados com os mais pigmentados e que existe associação entre pigmentação e fatores prognósticos como taxa mitótica e espessura. Ainda, as metástases apresentaram grau de pigmentação equivalente ao dos melanomas primários respectivos. Portanto, o grau de pigmentação por melanina nos melanomas primários pode ser um importante marcador histológico visto associar-se com critérios prognósticos e sobrevida global assim como a expressão de STAT6 e de MITF, uma vez que se associam com a presença de pigmentação nos melanomas.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, Ossama, et al. Cutaneous malignant melanoma: update on diagnostic and prognostic biomarkers. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 36, n. 5, p. 363-379, maio 2014.

ACOSTA, Álvaro Enrique, et al. Melanoma: patogénesis, clínica e histopatología. **Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica**, v. 17, n. 2, p. 87-108, jun. 2009

ALLEN, Kevin J. H., et al. Comparative Radioimmunotherapy of Experimental Melanoma with Novel Humanized Antibody to Melanin Labeled with 213Bismuth and 177Lutetium. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 7, p. 348, jul. 2019.

AMIN, Mahul B., et al. **AJCC Cancer Staging Manual (8th edition)**. Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer, 2017.

ANTUNES, Luís Carlos M., et al. Tropomyosin-Related Kinase Receptor and Neurotrophin Expression in Cutaneous Melanoma Is Associated with a Poor Prognosis and Decreased **Survival**. **Oncology** vol. 97, n1, p. 26-37, maio 2009.

ARNOLD, Melina, et al. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. **JAMA dermatology**, 10.1001/jamadermatol.2022.0160. 30 Mar. 2022.

BALCH Charles M., et al. A multifactorial analysis of melanoma: prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods. **Annals of Surgery**, v. 188, n. 6, p. 732-742, dez. 1978.

BELEAUA, Marius-Alexandru, et al. SOX11, SOX10 and MITF gene interaction: a possible diagnostic tool in malignant melanoma. **Life (Basel)**, v. 11, n. 4, p. 281, mar. 2021.

BEZZERRA, Sarita Maria F. M. C, et al. Effects of long-term chronic exposure to sun radiation in immunological system of commercial fishermen in Recife, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia** vol. 86, n 2, p 222-33, abril 2011.

BLOTTA, Rosa Maria, BAKOS, L. Uso de pesticidas e melanoma cutâneo. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 38, supl. 1, 2009. Disponível em: <http://www.acm.org.br/revista/pdf/artigos/701.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2021

BOSISIO, Francesca Maria, VAN DEN OORD, Joost J. Immunoplasticity in cutaneous melanoma: beyond pure morphology. **Virchows Archiv**, v. 470, n. 4, p. 357-369, abr. 2017.

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

BROUWER, Niels J., et al. Lack of tumour pigmentation in conjunctival melanoma is associated with light iris colour and worse prognosis. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 103, n. 3, p. 332-337, mar. 2019.

BROŻYNA, Anna A., et al. Melanin content in melanoma metastases affects the outcome of radiotherapy. **Oncotarget**, v. 7, n. 14, p. 17844-17853, abr. 2016.

CARLSON, J Andrew et al. Next-Generation Sequencing Reveals Pathway Activations and New Routes to Targeted Therapies in Cutaneous Metastatic Melanoma. **The American Journal of dermatopathology**, v. 39 n 1 p 1-13, Jan. 2017.

CARPENTIER, Antoine F., et al. Synthetic melanin bound to subunit vaccine antigens significantly enhances CD8+ T-cell responses. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. e0181403, jul. 2017.

CHAGAS, Carolina Costa, et al. Câncer relacionado ao trabalho: uma revisão sistemática. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 21, n. 2, p. 209-223, jun. 2013.

CHOI Hyun, et al. IL-4 inhibits the melanogenesis of normal human melanocytes through the JAK2-STAT6 signaling pathway. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 2, p. 528-536, fev. 2013.

COCHRAN, A. J. Histology and prognosis in malignant melanoma. **The Journal of Pathology**, v. 97, n. 3, p. 459-68, mar. 1969.

COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS (CAP). **Protocol for the examination of biopsy specimens from patients with melanoma of the skin**. Version 4.3.0.1. CAP, 2021. Disponível em: https://documents.cap.org/protocols/Skin.Melanoma.Bx_4.3.0.1.REL_CAPCP.pdf. Acesso em: 16 abr. 2021.

CUST, Anne E., et al. Melanoma - Role of the environment and genetics. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1853-1860, dez. 2018.

DAMSKY, William, KING, Brett A. JAK inhibitors in dermatology: the promise of a new drug class. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 4, p. 736-744, abr. 2017. DAVIS, 2019

DAVIS Lauren E., et al. Current state of melanoma diagnosis and treatment. **Cancer Biology & Therapy**, v. 20, n. 11, p. 1366-1379, 2019. DIFFEY, 2004

DIFFEY, Brian. Climate change, ozone depletion and the impact on ultraviolet exposure of human skin. **Physics in Medicine and Biology**, v. 49, n. 1, p. R1-11, jan. 2004.

D'MELLO, Stacey A. N., et al. Signaling pathways in melanogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1144, jul. 2016.

DZWIERZYNSKI, William W. Melanoma Risk Factors and Prevention. **Clinics in plastic surgery** v. 48, n 4, p 543-550, jul. 2021.

ELIADES, Philip, et al. High MITF expression is associated with super-enhancers and suppressed by CDK7 inhibition in melanoma. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 7, p. 1582-1590, jul. 2018.

FERRINGER, Tammie. Immunohistochemistry in dermatopathology. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 139, n. 1, p. 83-105, jan. 2015..

FORTES, Cristina, et al. Occupational exposure to pesticides with Occupational sun exposure increases the risk for cutaneous melanoma. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 58, n. 4, p. 370-375, abr. 2016.

FU, Cuiping, et al. Activation of the IL-4/STAT6 Signaling Pathway Promotes Lung Cancer Progression by Increasing M2 Myeloid Cells. **Frontiers in immunology** v. 10, n. 13, p.26-38, nov. 2019.

GAJULA, Rajendra P., GADDAMEEDHI, Shobhan. Commentary: Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 276, out. 2015.

GARBE, Claus, et al (a). European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: diagnostics - Update 2019. **European Journal of Cancer**, v. 126, p. 141-158, fev. 2020.

GARBE, Claus, et al (b). European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 2: treatment - Update 2019. **European Journal of Cancer**, v. 126, p. 159-177, fev. 2020.

GHIORZO, Paola, et al. CDKN2A and MC1R analysis in amelanotic and pigmented melanoma. **Melanoma Research**, v. 19, n. 3, p. 142-145, jun. 2009.

GOENKA, Shreevrat, KAPLAN, Mark. Transcriptional regulation by STAT6. **Immunologic research**, v. 50, n. 1, p 87-96, maio 2011.

GÓMEZ-GARCÍA, Francisco, et al. Drugs targeting the JAK/STAT pathway for the treatment of immune-mediated inflammatory skin diseases: protocol for a scoping review. **BMJ Open**, v. 9, n. 5, p. e028303, maio 2019.

GRILL, Christine, et al. MITF mutations associated with pigment deficiency syndromes and melanoma have different effects on protein function. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 21, p. 4357-4367, nov. 2013.

GUO, Wei, et al. Matched analysis of the prognosis of amelanotic and pigmented melanoma in head and neck. **Acta oto-laryngologica**, vol. 140, n. 9, 785-788, maio, 2020.

HALABAN, Ruth. Pigmentation in melanomas: changes manifesting under lying oncogenic and metabolic activities. **Oncology Research**, v. 13, n. 1, p. 3-8, 2002.

HARTMAN, Mariusz L., CZYZ, Malgorzata. Pro-survival role of MITF in melanoma. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 2, p. 352-358, fev. 2015 HIGGINS, 2015

HIGGINS, et al. Melanoma in situ: part I. Epidemiology, screening, and clinical features. **Journal of the American Academy of Dermatology**, n. 73, v. 2, p. 181-90, ago. 2015.

HOSSAIN, Md Razib, et al. Diversified stimuli-induced inflammatory pathways cause skin pigmentation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 3970, abr. 2021.

HSIAO, Jannifer J., FISHER, David E. The roles of microphthalmia-associated transcription factor and pigmentation in melanoma. **Archives of Biochemistry & Biophysics**, v. 563, p. 28-34, dez. 2014.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. **Melanoma of skin**. Globocan 2018. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/16-Melanoma-of-skin-fact-sheet.pdf>. Acesso em 31 out. 2020.

IVAN, Doina, PRIETO, Victor G. An update on reporting histopathologic prognostic factors in melanoma. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 135, n. 7, p. 825-829, jul. 2011.

Ji W, Liu Y, Xu B, Mei J, Cheng C, Xiao Y, Yang K, Huang W, Jiao J, Liu H, Shao J. Bioinformatics Analysis of Expression Profiles and Prognostic Values of the Signal Transducer and Activator of Transcription Family Genes in Glioma. **Front Genet**. 2021 Jul 2;12:625234. doi: 10.3389/fgene.2021.625234. PMID: 34276757; PMCID: PMC8283826.

JU, Kuk-Youn, et al. Unraveling the molecular nature of melanin changes in metastatic cancer. **Journal of Biomedical Optics**, v. 24, n. 5, p. 1-13, maio 2019.

JURMEISTER, Philipp, et al. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, nuclear S100A4, MITF and Ki67 for risk stratification of early-stage melanoma - A combined IHC score for melanoma risk stratification. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 17, n. 8, p. 800-808, ago. 2019.

KARPATHIOU, Georgia et al. STAT6: A review of a signaling pathway implicated in various diseases with a special emphasis in its usefulness in pathology. **Pathology, research and practice**, v. 223, n. 11, maio 2021.

KAWAKAMI, Akinori, FISHER, David E. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. **Laboratory Investigation**, v. 97, n. 6, p. 649-656, jun. 2017.

KINNAERT, E., et al. The degree of pigmentation modulates the radiosensitivity of human melanoma cells. **Radiation Research**, v. 154, n. 5, p. 497-502, nov. 2000.

LARRIBÈRE, Lionel, UTIKAL, Jochen. Stem Cell-Derived Models of Neural Crest Are Essential to Understand Melanoma Progression and Therapy Resistance. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 12 n. 111, maio 2019.

LARSEN, Tove Eeg, GRUDE, Tove Helliesen. A retrospective histological study of 669 cases of primary cutaneous malignant melanoma in clinical stage I: 1. Histological classification, sex and age of the patients, localization of tumour and prognosis. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 86A, n. 5, p. 437-450, set. 1978.

LEE, Hye Lee, et al. Tumor growth suppressive effect of IL-4 through p21-mediated activation of STAT6 in IL-4R α overexpressed melanoma models. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 23425-23438, abr. 2016.

LIU, Jue J., FISHER, David E. Lighting a path to pigmentation: mechanisms of MITF induction by UV. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 23, n. 6, p. 741-

LIU-SMITH, Feng, et al. Amyloids, melanins and oxidative stress in melanomagenesis. **Experimental Dermatology**, v. 24, n. 3, p. 171-174, mar. 2015.

LUCA, Roncati. Diagnostic, prognostic and predictive immunohistochemistry in malignant melanoma of the skin. **Klinicka Onkologie**, v. 31, n. 2, p. 152-155, 2018.

MAIZE, J. C. Primary cutaneous malignant melanoma. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 8, n. 6, p. 857-863, jun. 1983.

MARANDUCA, Minela Aida, et al. Synthesis and physiological implications of melanic pigments. **Oncology Letters**, v. 17, n. 5, p. 4183-4187, maio 2019.

MCKENZIE, Richard. **UV radiation in the melanoma capital of the world: what makes New Zealand so different?** AIP Conference Proceedings 1810, 020003 (2017). Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.4975499>. Acesso em: 16 abr. 2021.

MENDONÇA SANCHES, M.; SOARES DE ALMEIDA, L.; FREITAS, J. P. Genes and Melanoma. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, v. 75, n. 3, p. 231-238, 22 Jan. 2018.

MIHM JR, Martin C., MULÉ James J. Reflections on the histopathology of tumor-Infiltrating lymphocytes in melanoma and the host immune response. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 8, p. 827-835, ago. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2020. Câncer de pele**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios>. Acesso em: 26 out. 2020.

MIOT, Luciane Donida Bartoli, et al. Fisiopatologia do melasma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 6, p. 623-635, dez. 2009.

MOON, J. S., OH, C. H. Solar damage in skin tumors: quantification of elastotic material. **Dermatology**, v. 202, n. 4, p. 289-292, 2001. MOREAU, 2013

MOREAU, Jacqueline F., et al. Characteristics and survival of patients with invasive amelanotic melanoma in the USA. **Melanoma Research**, v. 23, n. 5, p. 408-413, out. 2013.

NAFFOUJE, Samer, et al. Microphthalmia transcription factor in malignant melanoma predicts occult sentinel lymph node metastases and survival. **Melanoma Research**, v. 25, n. 6, p. 496-502, dez. 2015.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer Stat Facts: melanoma of the skin**. Melanoma of the skin – Cancer Stat Facts. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>. Acesso em: 31 out. 2020.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **STAT6, signal transducer and activator of transcription 6 [*Homo sapiens* (human)]**. Gene ID: 6778. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6778>. Acesso em 05 jan. 2020.

NGUYEN, Nhu T., FISHER, David E. MITF and UV responses in skin: from pigmentation to addiction. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 32, n. 2, p. 224-236, mar. 2019.

NOONAN, Frances P., et al. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. **Nature Communications**, v. 3, p.884, jun. 2012.

NORVAL, M., et al. The human health effects of ozone depletion and interactions with climate change. **Photochemical & Photobiology Sciences**, v. 10, n. 2, p. 199-225, fev. 2011. NOSANCHUK, 2018.

NOSANCHUK, J. D., et al. Structure-function analysis and therapeutic efficacy of antibodies to fungal melanin for melanoma radioimmunotherapy. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5466, abr. 2018.

OCANHA-XAVIER, Juliana Polizel, et al. Melanoma: clinical, evolutive and histopathological characteristics of a series of 136 cases. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 93, n. 3, p. 373-376, mai/jun 2018.

OWEN, Katie L., et al. JAK-STAT signaling: a double-edged sword of immune regulation and cancer progression. **Cancers (Basel)**, v. 11, n. 12, p. 2002, 2019.

OZAKI, Saeko, et al. Melanotic malignant melanoma in oculocutaneous albinism type 4. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 97, n. 2, 287-288, fev. 2016.

PAN Fuqiang, et al. Prognostic value of key genes of the JAK-STAT signaling pathway in patients with cutaneous melanoma. **Oncology Letters**, v. 19, n. 3, p. 1928-1946, mar. 2020.

PAOLINO, Giovanni et al. Clinicopathological and dermoscopic features of amelanotic and hypomelanotic melanoma: a retrospective multicentric study. **International journal of dermatology**, v. 59, n.11. p. 1371-1380, 2020.

PARK, Soo Jung et al. Epigenetic downregulation of STAT6 increases HIF-1 α expression via mTOR/S6K/S6, leading to enhanced hypoxic viability of glioma cells. **Acta neuropathologica communications**. V. 17, n, 7, p. 149. set. 2019.

PEARLMAN Ross L., et al. Potential therapeutic targets of epithelial-mesenchymal transition in melanoma. *Cancer Lett*, v. 391, p. 125-140, abr. 2017.

PICARDO, Mauro, SLOMINSKI, Andrzej T. Melanin pigmentation and melanoma. **Experimental Dermatology**, v. 26, n. 7, p. 555-556, jul 2017.

PILLAIYAR, Thanigaimalai et al. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. **Cellular signalling**, v. 40, p. 99-115, set. 2017.

RUIZ-SANCHEZ, D., et al. Amelanotic melanoma in a patient with oculocutaneous albinism. **Dermatology Online Journal**, v. 26, n. 5, p. 13030/qt2gv5w93x, maio 2020.

SALIBA E, BHAWAN J. Aberrant Expression of Immunohistochemical Markers in Malignant Melanoma: A Review. **Dermatopathology** (Basel), v. 8, n. 3, p. 359-370, ago. 2021.

SALTI Gi, et al. Microphthalmia transcription factor: a new prognostic marker in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. **Cancer research**, v. 60 n. 18, p5012-6, set. 2000.

SAMPLE, Ashley, HE, Yu-Ying. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 34, n. 1, p. 13-24, jan. 2018.

SANTOS, Fernando de Marco dos, et al (a). Association between tumor-infiltrating lymphocytes and sentinel lymph node positivity in thin melanoma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94, n. 1, p. 47-51, jan/fev. 2019.

SANTOS, Marcos, et al (b). Diretrizes oncológicas 2. São Paulo: Doctor Press Ed. Científica, 2019. P. 525 a 535.

SARNA Michal, et al. Cell elasticity is an important indicator of the metastatic phenotype of melanoma cells. **Experimental Dermatology**, v. 23, n. 11, p. 813-818, nov. 2014.

SARNA Michal, et al. Nanomechanical phenotype of melanoma cells depends solely on the amount of endogenous pigment in the cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 607, fev. 2018.

SARNA, Michal, et al. Melanin presence inhibits melanoma cell spread in mice in a unique mechanical fashion. **Science Reports**, v. 9, n. 1, p. 9280, 2019.

SEGATTO, Majoriê M., et al. Residential and occupational exposure to pesticides may increase risk for cutaneous melanoma: a case-control study conducted in the south of Brazil. **International Journal of Dermatology**, v. 54, n. 12, p. e527-538, dez. 2015.

SHAKHOVA O. Neural crest stem cells in melanoma development. **Curr Opin Oncol**. 2014 Mar;26(2):215-21. doi: 10.1097/CCO.000000000000046. PMID: 24441506.

SHARMA, Krishna V., DAVIDS, Lester M. Depigmentation in melanomas increases the efficacy of hypericin-mediated photodynamic-induced cell death. **Photodiagnosis & Photodynamics Therapy**, v. 9, n. 2, p. 156-163, jun. 2012.

SŁAWIŃSKA, M et al. STAT3, STAT5A, STAT5B and STAT6 proteins are overexpressed in human basal cell carcinoma. **Clinical and experimental dermatology**, v. 45, n. 2, p. 165-171, ago. 2020.

SLOMINSKI, Andrzej T., et al (b). Melanoma resistance: a bright future for academicians and a challenge for patient advocates. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 89, n. 4, p. 429-433, abr. 2014.

SLOMINSKI, Andrzej, et al (a). The role of melanogenesis in regulation of melanoma behavior: melanogenesis leads to stimulation of HIF-1 α expression and HIF-dependent attendant pathways. **Archives of Biochemistry & Biophysics**, v. 563, p. 79-93, dez. 2014.

SLOMINSKI, Andrzej, et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 4, p. 1155-1228, out. 2004.

SLOMINSKI, Radomir M., et al. The role of melanin pigment in melanoma. **Experimental Dermatology**, v. 24, n. 4, p. 258-259, abr. 2015.

SLOMINSKI, Radomir M. Melanoma, Melanin, and Melanogenesis: The Yin and Yang Relationship. **Frontier Oncology**. 2022 Mar 14;12:842496. doi: 10.3389/fonc.2022.842496.

SON, Dong Ju, et al. Activated natural killer cells mediate the suppressive effect of interleukin-4 on tumor development via STAT6 activation in an atopic condition melanoma model. **Neoplasia**, v. 19, n. 7, p. 537–548, jul. 2017.

STEGLICH, Raquel Bissacotti, et al. Epidemiological and histopathological aspects of primary cutaneous melanoma in residentes of Joinville, 2003-2014. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 93, n. 1, p. 45-53, jan/fev. 2018.

SWOBODA, Alexander, et al. STAT3 promotes melanoma metastasis by CEBP-induced repression of the MITF pigmentation pathway. **Oncogene**, v. 40, n. 6, p. 1091-1105, fev. 2021 [2018].

THOMAS, Nancy E., et al. Comparison of clinicopathologic features and survival of histopathologically amelanotic and pigmented melanomas: a population-based study. **JAMA Dermatology**, v. 150, n. 12, p. 1306-1314, dez. 2014.

TOD, B. M., et al. The incidence of melanoma in South Africa: An exploratory analysis of National Cancer Registry data from 2005 to 2013 with a specific focus on melanoma in black Africans. **South African Medical Journal**, v. 109, n. 4, p. 246-253, mar. 2019.

VACHTENHEIM, Jiri. The many roles of MITF in melanoma. **Single Cell Biology**, v. 6, n. 2, p. 1000162, 2017.

VAQUERIZAS, Juan M., et al. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. **Nature Reviews. Genetics**, v. 10, n. 4, p. 252-263, abr. 2009.

VIJAYASARADHI S., HOUGHTON A. N. Melanoma and melanocytes: pigmentation, tumor progression, and the immune response to cancer. **Advances in Pharmacology**, v. 32, p. 343-374, 1995.

WASIEWICZ, Tomasz, et al. Antitumor effects of vitamin D analogs on hamster and mouse melanoma cell lines in relation to melanin pigmentation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 6645-6667, mar. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO classification of skin tumors**. World Health Organization of Tumors, 4^a ed, vol. 11. Lyon: France, 2018.

YE, Yanqi, et al. A melanin-mediated cancer immunotherapy patch. **Science Immunology**, v. 2, n. 17, p. eaan5692, nov. 2017.

ZHUANG, Liqing et al. Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. **Modern pathology**, v.20, n. 4. P. 16-26, abril 2007.

APÊNDICES
APÊNDICE A – ARTIGO 1

TITLE PAGE

STAT6 expression is associated with the degree of pigmentation in melanomas

Karina Munhoz de Paula Alves Coelho^{a,b*}, Arthur Fausto Siqueira Simões Júnior^b,
Jaqueline Stall^{a,b}, Paulo Henrique Condeixa de França^a

^a Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, Paulo Malschitzki St, 10, 89219-710, Joinville, Santa Catarina, Brazil.

^b Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos - CEDAP, Mario Lobo St, 61, 89201-330, Joinville, Santa Catarina, Brazil.

* Correspondence to:

Karina Munhoz de Paula Alves Coelho

Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos - CEDAP

Mario Lobo St, 61, 89201-330, Joinville, Santa Catarina, Brazil.

Tel.: +55 047 34229607

Fax: +55 047 34339499

E-mail: karinamunhoz@hotmail.com

Abstract

Melanin can affect the invasion and metastasis capacity of melanomas and interfere with the therapeutic response. However, the association between melanoma pigmentation and prognosis remains to be elucidated. In normal melanocytes, melanogenesis can be inhibited through the JAK-STAT6 pathway, which results in decreased melanin production. The STAT6 transcription factor has been suggested as a prognostic marker for melanoma. Therefore, this study aimed to evaluate the association of melanin pigmentation in primary melanomas with STAT6 expression, pigmentation in corresponding metastases, prognostic criteria, and overall survival. In this cross-sectional study, 201 primary melanomas were analyzed histologically regarding the degree of pigmentation and the findings were correlated with thickness, mitotic rate, overall survival, and degree of pigmentation in 28 corresponding metastases. The association of pigmentation with the immunohistochemical expression of STAT6 was evaluated in 91 samples. *In silico* analysis was used to assess the association with transcriptional levels in 339 cases. Seventy (34.8%) primary melanomas exhibited severe pigmentation, 63 (31.3%) moderate pigmentation, 47 (23.4%) mild pigmentation, and 21 (10.5%) were negative. The degree of pigmentation was associated with thickness, mitotic rate, and overall survival ($p = 0.009$, < 0.001 and 0.002 , respectively). The degree of pigmentation in metastases was equivalent to that of the respective primary melanomas. STAT6 expression (immunohistochemical and *in silico* mRNA) was associated with pigmentation. The degree of melanin pigmentation in primary melanomas may be an important histological marker since it is associated with prognostic criteria and overall survival. Additionally, transcriptional levels of the *STAT6* gene and its immunohistochemical expression are correlated with the degree of melanin pigmentation in melanomas.

Keywords: Melanoma, pigmentation, prognosis, STAT6

1. Introduction

Melanoma is a multifactorial disease that is caused by a combination of genetic susceptibility and environmental exposure. Most cases are the result of indirect damage to deoxyribonucleic acid triggered by ultraviolet A radiation [1]. The histological types of melanoma and their respective molecular characteristics are related to different degrees of cumulative solar damage [2]. The highest incidence of melanoma is observed in countries with populations with lighter skin phototypes, i.e., with a lower amount of melanin, especially eumelanin [3].

The biosynthesis of melanin is regulated by sun exposure and by many hormonal factors at the tissue, cellular, and subcellular levels. While melanin protects against the development of skin cancers, including cutaneous melanoma, its presence may be necessary for the malignant transformation of melanocytes induced by oxidative DNA damage [4,5]. This relationship between melanin and melanoma development is not intuitive since most of the available knowledge about this pigment generally indicates a protective effect [6].

The presence of melanin can affect the invasion and metastasis capacity of melanomas and might be implicated in the therapeutic response [7]. However, the association between pigmentation and melanoma prognosis remains to be elucidated. In 2014, melanin granules were found to modify the elastic properties of melanoma cells and to inhibit their transmigration ability [8]. A subsequent study suggested that melanin inhibits the metastasis capacity of melanomas [9].

Melanin synthesis is determined by complex interaction processes among diverse biological functions [10]. Depending on the stage of the disease, melanoma cells share phenotypes of neural crest cells. These phenotypes are controlled by specific signaling pathways and by transcription factors such as microphthalmia-associated transcription factor (MITF), which is one of the main factors responsible for controlling pigmentation [11,12].

In normal melanocytes, MITF can be inhibited by the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 6 (JAK-STAT6) pathway, which results in decreased melanogenesis [13,14]. The JAK-STAT pathway mediates the signaling of nearly all immune regulatory processes, including those involved in tumor cell recognition [15].

The STAT6 transcription factor is activated mainly by IL-4 and IL-13 and plays a role in the development of different tumors, participating in the regulation of the tumor microenvironment [16-18]. STAT6 has been linked to tumor initiation and progression, particularly in lymphomas and solitary fibrous tumors [15]. Furthermore, this transcription factor seems to be involved in the survival of gliomas and its epigenetic restoration may be an alternative therapy for these tumors [19].

The expression of key genes in JAK-STAT signaling in different types of cancer has diverse roles. Studies have suggested the use of expression of *STAT* genes, including STAT6, as a potential prognostic biomarker in cutaneous melanoma [20]. However, few studies have investigated the prognostic value of JAK-STAT signaling pathway genes in melanoma [14]. Furthermore, a better understanding is needed of how proinflammatory cytokines, which are elevated in human skin diseases, affect the JAK-STAT pathway in terms of the regulation of melanocyte function and melanogenesis [13].

The aim of this study was to evaluate the association of melanin pigmentation in primary melanomas with STAT6 expression, pigmentation in corresponding metastases, prognostic criteria (thickness and mitotic rate), and overall survival.

2. Materials and methods

2.1. Histological and immunohistochemical analysis

2.1.1. Study design and location

This cross-sectional, retrospective study used samples of melanomas selected from the database of a pathological anatomy laboratory. The samples were obtained from patients of the municipal public health network who were diagnosed with primary melanoma between 2011 and 2015 and with corresponding metastases between 2011 and 2020. Analyses of the database information, as well as histological and immunohistochemical analysis, were performed from January 2020 to June 2021.

2.1.2. Samples and inclusion and exclusion criteria

A total of 235 samples from patients of both sexes older than 18 years were selected, including 203 primary melanomas and 28 metastatic melanomas. Four micrometastases were excluded because of the impossibility to assess the degree of pigmentation; two primary melanomas were also excluded, including one sample that was removed from the laboratory and one sample in which the quality of the slide was compromised after new staining. For immunohistochemical analysis of STAT6 expression, primary melanomas thicker than 1.0 mm were selected, totaling 91 samples.

2.1.3. Database

Clinicopathological characteristics and the variables thickness, number of mitoses and metastases were obtained from the anatomopathological reports. Based on these data, the anatomopathological stage was reclassified according to the 8th edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) classification [21]. Agreement between two pathologists was obtained for all diagnoses in the database. Information on 5-year overall survival was obtained from the pathological anatomy laboratory database and from the Mortality Information System (SIM; <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svs/sistemas-de-informacao/sistema-de-informacoes-sobre-mortalidade-sim>). Overall survival was defined as the time from first diagnosis to the date of death or last follow-up. Deaths from non-melanoma causes were excluded from the analysis.

2.1.4. Laboratory procedures

The samples were obtained from whole tumors embedded in paraffin blocks. The histological slides of all samples were stained with hematoxylin-eosin and the degree of melanin pigmentation was determined by two observers. Melanin pigmentation was graded visually as negative, mild, moderate, and severe, as described previously [22].

For immunohistochemical analysis of STAT6 expression, 4- μ m-thick sections were cut and mounted on silanized histological slides. Immunohistochemical staining was performed in an automated system (Autostainer Link 48, Dako, Glostrup, Denmark) using rabbit anti-STAT6 monoclonal antibody (clone EP325, CellMarque™

Tissue Diagnosis, Darmstadt, Germany), diluted 1:100. The reaction was developed by incubating the slides with the EnVision FLEX HRP Magenta Substrate Chromogen System (Dako) for 5 minutes. The slides were counterstained with Gill's hematoxylin. Samples of solitary fibrous tumor were used as positive control. Normal skin keratinocytes served as negative control.

Immunohistochemical expression of STAT6 was evaluated in the nucleus and cytoplasm. Two observers who were unaware of the patient's clinical data analyzed the slides. The H-score was determined by multiplication of the intensity (0: no staining; 1: weak staining; 2: moderate staining; 3: strong staining) by the respective percentage of stained tumor cells, at 10% intervals, resulting in values of 0 to 300. Samples with a H-score higher than the median were classified as positive [23].

2.2. *In silico* analysis

In silico analysis was performed using data from the melanoma set from The Cancer Genome Atlas (TCGA) portal (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga>). The expression of *STAT6* mRNA was evaluated in relation to melanin pigmentation according to availability in the dataset (AKBANI, 2015) [24]. The expression of mRNA was normalized on the R2 Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>) and is illustrated in boxplots as log₂ transformed signal intensity.

2.3. *Statistical analysis*

The Jamovi 2.2.5 software was used (<https://www.jamovi.org>). Interrater reliability was determined using Cohen's kappa. The chi-squared and Kruskal-Wallis tests were applied to evaluate the association between variables. Overall survival was analyzed by the Kaplan-Meier method. A p value less than 0.05 was considered to be significant.

In *in silico* analysis, subgroups were compared by ANOVA using the Kruskal-Wallis test, followed by Tukey's post-hoc test. The results are reported as median and whiskers (minimum-maximum). Significant differences were defined when $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.0001$.

3. Results

3.1. Histological and immunohistochemical analysis

Table 1 shows the characteristics of the sample (sex, age, anatomical tumor location, tumor-node-metastasis [TNM] stage, and histological type) in the primary melanoma group (n = 201), in the subgroup of primary melanomas thicker than 1.0 mm used for STAT6 immunoexpression analysis (n = 91), and in the metastatic melanoma group (n = 28).

Table 1. Clinicopathological characteristics of the sample studied.

	Primary melanomas, n (%)	Primary melanomas, STAT6 subgroup, n (%)	Metastatic melanomas, n (%)
Gender			
Male	92 (45.8)	45 (49.5)	18 (64.3)
Female	109 (54.2)	46 (50.5)	10 (35.7)
Mean age (SD), years	59.4 (± 14.5)	61 (± 16.3)	60.6 (± 26.9)
Tumor location			
Primary melanoma			
Trunk	92 (45.8)	39 (42.9)	-
Head and neck	44 (21.9)	17 (18.7)	-
Upper limbs	37 (18.4)	17 (18.7)	-
Lower limbs	28 (13.9)	18 (19.8)	-
Metastatic melanoma			
Lymph node	-	-	16 (57.1)
Skin	-	-	7 (25.0)
Central nervous system	-	-	3 (10.7)
Intestine	-	-	1 (3.6)
Lung	-	-	1 (3.6)
TNM stage			
0	30 (14.9)	-	-
Ia	61 (30.3)	-	-
Ib	18 (9)	-	-
IIa	28 (13.9)	27 (29.7)	-
IIb	2 (1)	2 (2.2)	-
IIIa	6 (3.0)	6 (6.6)	-
IIIb	13 (6.5)	13 (14.3)	-
IVa	12 (6.0)	12 (13.2)	-
IVb	31 (15.4)	31 (34.1)	-
Histological type			
Superficial dissemination	133 (66.2)	38 (41.8)	-
Nodular	45 (22.4)	45 (49.5)	-
LM/LMM	14 (7.0)	0 (0)	-
Acral	6 (3.0)	5 (5.5)	-
Desmoplastic	3 (1.5)	3 (3.3)	-

SD: standard deviation; LM/LMM: lentigo maligna/lentigo maligna melanoma.

Cohen's kappa statistic showed substantial interrater reliability for the histological analysis of melanin pigmentation in primary and metastatic melanomas ($k = 0.622$ and $k = 0.714$, respectively).

There was a predominance of severe pigmentation in primary melanomas, with 70 (34.8%) samples, followed by moderate pigmentation in 63 (31.3%), mild pigmentation in 47 (23.4%), and negative pigmentation in 21 (10.5%). Figure 1 shows representative images of samples with different degrees of melanin pigmentation in primary melanomas.

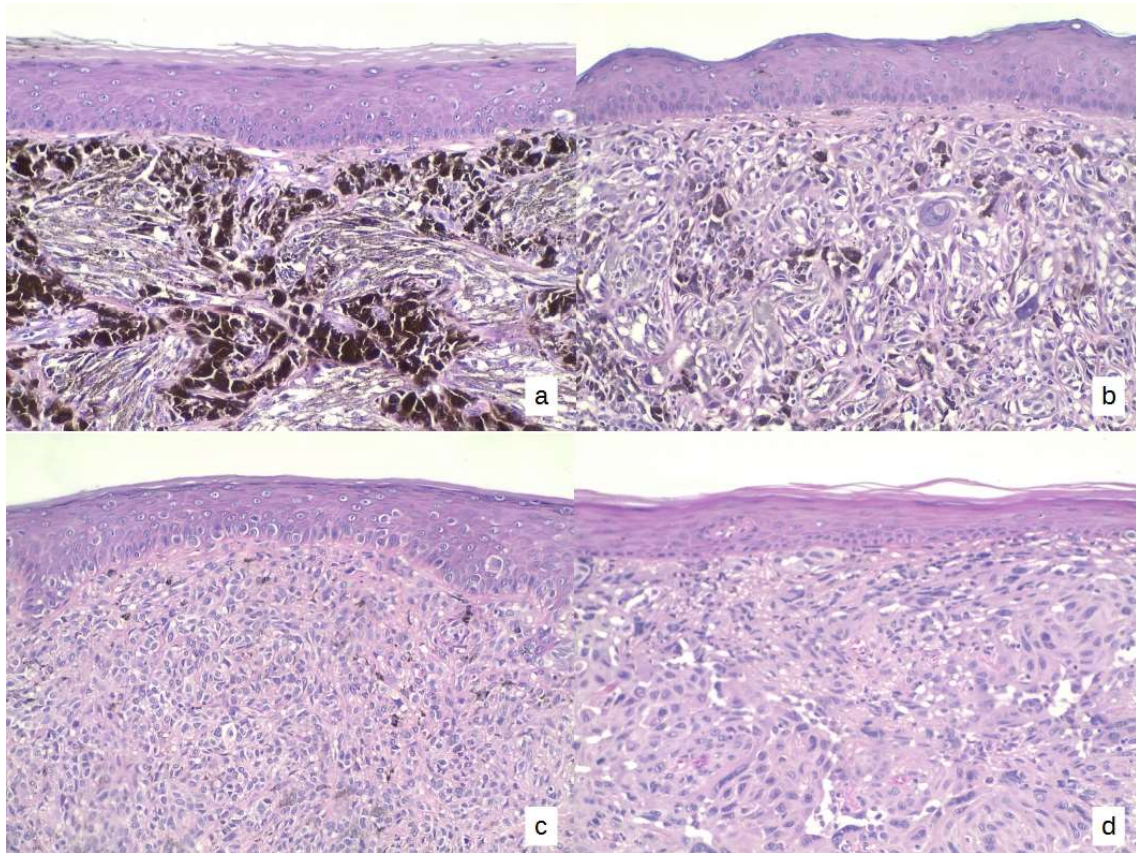


Fig. 1. Histological grading of melanin pigmentation in primary melanomas: a) severe, b) moderate, c) mild, and d) absent (negative). Hematoxylin-eosin staining. Magnification: 200x.

Metastatic melanomas exhibited a predominance of mild melanin pigmentation, with 9 (32.1%) samples, followed by moderate pigmentation in 8 (28.6%), severe pigmentation in 6 (21.4%), and negative pigmentation in 5 (17.9%). The association of the histological degree of pigmentation in primary melanomas with the degree of pigmentation in corresponding metastases, thickness, mitosis and survival is presented in Table 2.

Table 2. Association between the histological degree of pigmentation in primary melanomas and clinicopathological criteria, pigmentation in metastases, and overall survival.

Variable	Cases, n	Pigmentation in primary melanoma, n (%)				p
		Negative (n = 21)	Mild (n = 47)	Moderate (n = 63)	Severe (n = 70)	
Thickness (mm)						
≤ 1.0	109	0 (0.0)	22 (46.8)	36 (57.1)	51 (46.8)	0.009
> 1.0 - 2.0	30	3 (14.3)	6 (13.7)	10 (15.9)	11 (36.7)	
> 2.0 - 4.0	19	4 (19.0)	5 (10.6)	6 (9.5)	4 (21.1)	
> 4.0	43	14 (66.7)	14 (29.8)	11 (17.5)	4 (9.3)	
Mitoses						
< 1	78	0 (0.0)	16 (34.0)	29 (46.0)	33 (47.1)	< 0.001
≥ 1	123	21 (100.0)	31 (66.0)	34 (54.0)	37 (52.9)	
Pigmentation in metastases *						
Equal to	21	4 (66.7)	6 (75.0)	7 (70.0)	4 (100.0)	0.639
Different	7	2 (33.3)	2 (25.0)	3 (30.0)	0 (0)	
Five-year survival						
Yes	24	7 (35)	6 (13.6)	9 (15.5)	2 (3.0)	0.002
No	165	13 (65)	38 (86.4)	49 (84.5)	65 (97.0)	

* Degree of pigmentation in metastatic melanoma equal to or different from the degree of pigmentation in the respective primary melanoma.

Five-year survival differed between pigmentation groups and was higher in more pigmented melanomas. Kaplan-Meier analysis (Figure 2) showed that overall survival was inversely associated with the degree of pigmentation ($p = 0.0014$).

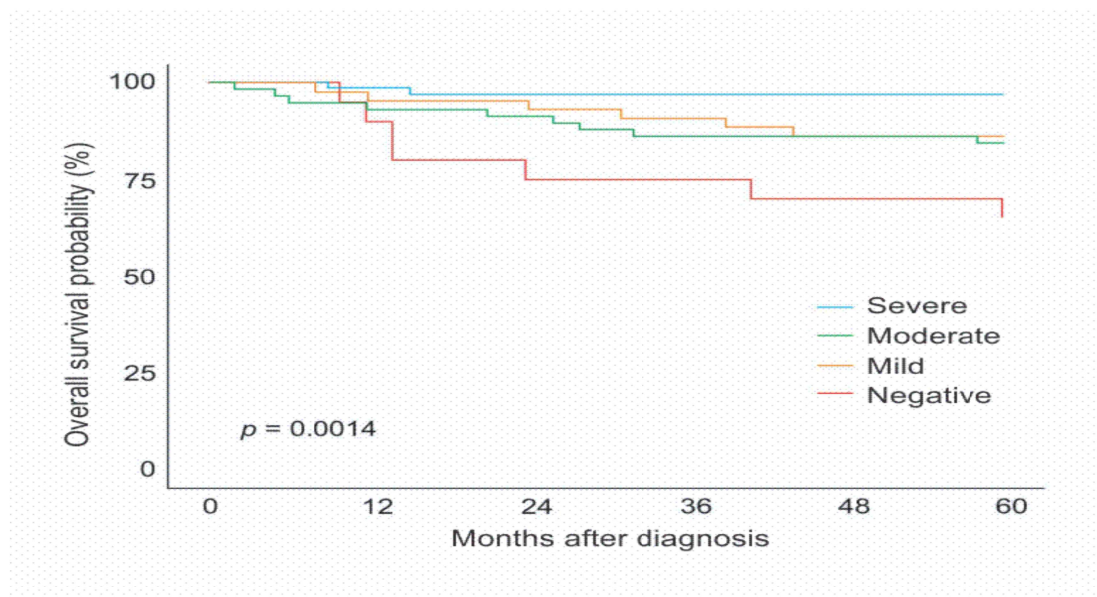


Fig. 2. Kaplan-Meier curves showing the relationship between overall survival and degree of melanin pigmentation in melanomas: light blue – severe pigmentation ($n = 70$); green – moderate pigmentation ($n = 63$); red – mild pigmentation ($n = 47$); dark blue – negative ($n = 21$).

Regarding the subgroup of primary melanomas selected for analysis of STAT6 expression, Cohen's kappa statistic used to assess interrater reliability in histological analysis of melanin pigmentation and immunohistochemical analysis of STAT6 showed perfect ($k = 1.0$) and substantial agreement ($k = 0.803$), respectively.

Immunohistochemical expression of STAT6 (H-score > 5) was detected in 86 (94.5%) samples. The median STAT6 expression score was 85. Figure 3 shows

representative samples of immunohistochemical expression of STAT6 in normal skin, solitary fibrous tumor and melanomas, with expression ≤ 85 and > 85 .

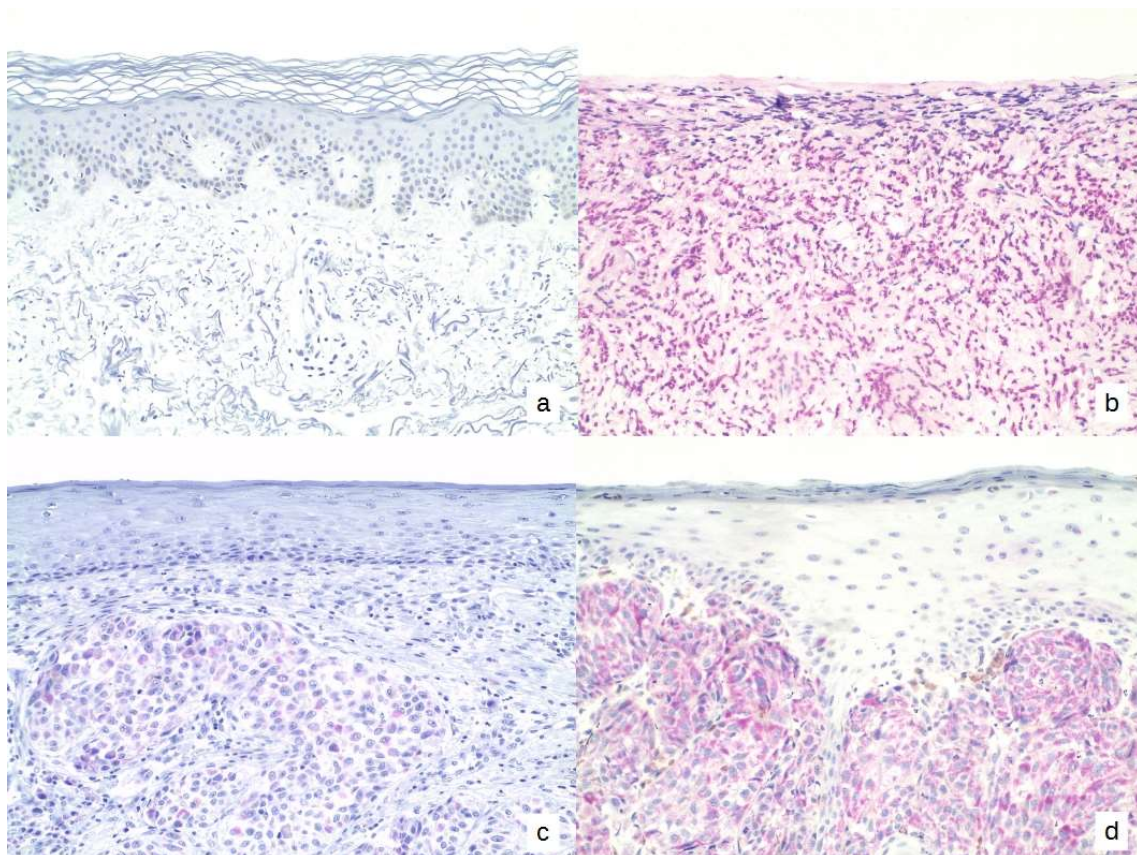


Fig. 3. Images of representative samples of immunohistochemical expression of STAT6: a) absence of expression in normal skin keratinocytes; b) strong and predominantly nuclear expression in solitary fibrous tumor; c) weak and predominantly cytoplasmic expression in a melanoma specimen with score ≤ 85 ; d) strong and predominantly cytoplasmic expression in a melanoma sample with > 85 . Magnification: 200x.

Among the 91 samples selected for immunohistochemical analysis of STAT6, 70 (76.9%) exhibited pigmentation and STAT6 expression above the median was observed in 38 (54.3%) of these samples. On the other hand, 6 (28.6%) of the 21 (23.1%) non-pigmented samples exhibited expression above the median. The difference observed between these groups was statistically significant ($p = 0.039$).

3.2. *In silico* analysis

In silico analysis of data from 329 melanomas for assessing the correlation between the transcriptional level of *STAT6* and melanin pigmentation score showed significantly higher *STAT6* mRNA levels with increasing pigmentation score when compared to the absence of pigmentation (Figure 4).

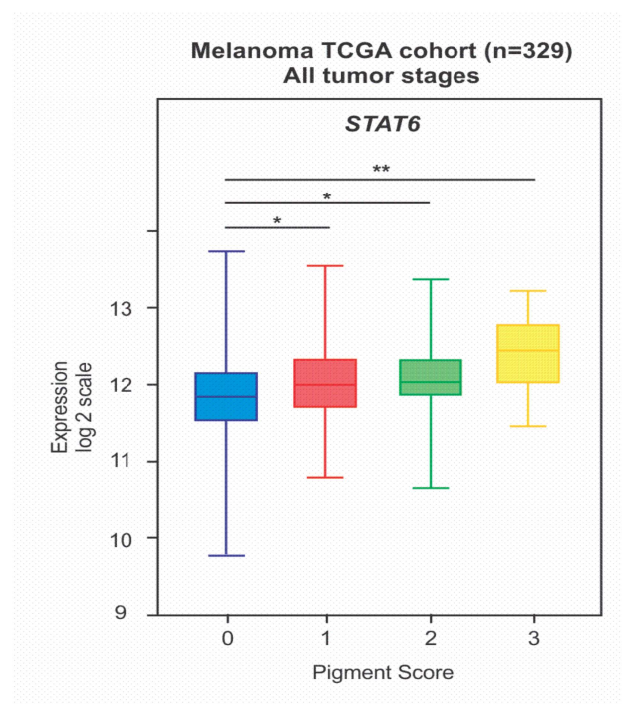


Fig. 4. Transcriptional levels of the *STAT6* gene according to pigmentation score in melanomas. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.0001$.

4. Discussion

In the present study, we identified cytoplasmic and nuclear STAT6 expression in the majority of melanoma samples analyzed by immunohistochemistry (n = 86; 94.5%), as well as high levels of *STAT6* mRNA in the *in silico* analysis. A recent study that also used TCGA data found that low levels of *STAT6* expression are associated with a favorable prognosis, suggesting that this gene could be used as a potential prognostic biomarker [20].

Studies have shown different levels of expression of JAK-STAT pathway genes in breast, ovarian, lung, brain and colorectal cancer, which may be associated with different prognoses [18,20]. Expression of STAT1/2/3/5A/6 in gliomas was found to be correlated with mutations in the isocitrate dehydrogenase (*IDH*) gene [25]. A study on mice showed that IL-4/STAT6 signaling in CD11b+ cells promotes the progression of lung cancer. The authors concluded that STAT6 may be a possible target for the prevention and treatment of lung cancer [26].

In our study, analysis of the association between immunohistochemical expression of STAT6 and melanin pigmentation revealed a significant difference between groups (p = 0.039). Evaluating the correlation between STAT6 transcriptional level and pigmentation score, we found a significant increase in the expression of the gene with increasing pigmentation score of the tumors. One study showed that IL-4 directly inhibits melanogenesis in normal melanocytes via the JAK-STAT6 pathway by negatively regulating both the transcription and translation of genes associated with melanogenesis, such as *MITF* [13]. According to CARLSON et al. (2017), the absence of melanin in melanomas is correlated with an increase in the average number of genetic alterations [27].

We also found that a lower degree of melanin pigmentation in melanomas was associated with poor overall survival (p = 0.0014). In 1969, Cochran microscopically evaluated pigmentation in 136 melanomas and did not find significant differences in survival between groups with absent, mild, moderate and severe pigmentation. On the other hand, Balch et al. (1978), studying 339 melanomas, identified a 5-year survival rate of 36% for non-pigmented melanomas, while that of pigmented melanomas was 68% (p = 0.006). Absent pigmentation was more frequent in thicker melanomas (p = 0.05) [22]. In other studies, amelanotic melanomas had a worse prognosis but this finding was associated with greater thickness at diagnosis [28,29]. Breslow thickness is the most important prognostic factor and determines the tumor stage [30]. A larger number of mitoses has been described in amelanotic melanomas

regardless of thickness, suggesting that these tumors grow faster than pigmented ones [31].

When analyzing the association between tumor thickness and the degree of pigmentation, we found a difference between groups ($p = 0.009$), with a higher degree of pigmentation predominating in thinner tumors. A study of 3,467 melanoma samples identified 275 (8%) amelanotic melanomas and found that increased Breslow thickness was independently associated with amelanotic melanoma ($p < 0.05$). In that study, the risk of death due to melanoma was higher for amelanotic melanomas compared to pigmented ones ($p < 0.001$); however, there was no difference in survival when the analysis was adjusted for tumor stage ($p = 0.36$) [31].

In the present study, the mitotic rate was higher in melanomas with a lower degree of pigmentation ($p < 0.001$). Thomas et al. (2014) found the presence of mitoses to be independently associated with amelanotic melanomas and suggested that these melanomas therefore develop more rapidly [31].

We found no significant difference in the degree of melanin pigmentation between the groups of primary melanomas and corresponding metastases ($p = 0.639$). The presence of melanin in melanoma metastases seems to interfere with therapeutic responses. Kinnaert et al. (2000) suggested that intracellular melanin is inversely associated with the radiosensitivity of melanoma cells, a fact that may explain, at least in part, the controversial responses to ionizing radiation observed in the treatment of melanomas [32]. Another study showed that patients in stages 3 and 4, both with primary melanotic melanomas and pigmented lymph node metastases, had significantly shorter disease-free and overall survival than those with amelanotic or poorly melanized melanomas [33].

The main limitation of our study was its retrospective design using data from a database, particularly in terms of survival assessment. In addition, there was no control group regarding patient treatment.

We conclude that the degree of melanin pigmentation in primary melanomas is associated with prognostic criteria and with overall survival and that the degree of pigmentation is similar in corresponding metastases. Furthermore, transcriptional levels of the *STAT6* gene and its immunohistochemical expression are correlated with the degree of melanin pigmentation in melanomas.

Ethics approval

The project was approved by the Research Ethics Committee (Approval number 4.037.886) and the study was conducted in accordance with the guidelines of Resolution 466/2012 of the Brazilian National Health Council.

Funding

The authors received financial support from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos (CEDAP).

CRedit authorship contribution statement

K. M. P. A. Coelho: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Supervision, Validation, Roles/Writing - original draft, Writing - review & editing. **A. F. S. Simões Júnior:** Conceptualization, Investigation, Visualization. **J. Stall:** Project administration, Writing - review & editing. **P. H. C. França:** Data curation, Funding acquisition, Resources, Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

All authors report no conflict of interest relevant to this article.

Acknowledgements

The authors are grateful to the CEDAP team with the help given in several aspects of this work.

References

- [1] W. Dzwierzynski, Melanoma risk factors and prevention, *Clin Plast Surg.* 48 (4) (2021) 543-550, <http://doi.org/10.1016/j.cps.2021.05.001>.
- [2] C. Garbe, T. Amaral, K. Peris, et al., European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics - Update 2019, *Eur J Cancer.* 126 (2020) 141-158, <http://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.11.014>.
- [3] R. McKenzie, UV radiation in the melanoma capital of the world: what makes New Zealand so different? *AIP Conference Proceedings* 1810, 020003 (2017). Available at: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4975499>, <http://doi.org/10.1063/1.4975499>.
- [4] R. M. Slominski RM, Sarna T, Płonka PM, Raman C, Brożyna AA, Slominski AT, Melanoma, Melanin, and Melanogenesis: The Yin and Yang Relationship. *Front Oncol.* (12) (2022) 842496, <http://doi.org/10.3389/fonc.2022.842496>.
- [5] R. P. Gajula, S. Gaddameedhi, Commentary: Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure, *Front Physiol.* 6 (2015) 276, <http://doi.org/10.3389/fphys.2015.00276>.
- [6] F. Liu-Smith, C. Poe, P. J. Farmer, F. L. Meyskens Jr, Amyloids, melanins and oxidative stress in melanomagenesis, *Exp Dermatol.* 24 (3) (2015) 171-174, <http://doi.org/10.1111/exd.12559>.
- [7] R. M. Slominski, M. A. Zmijewski, A. T. Slominski, The role of melanin pigment in melanoma, *Exp Dermatol.* 24 (4) (2015) 258-259, <http://doi.org/10.1111/exd.12618>.
- [8] M. Sarna, A. Zadło, P. Hermanowicz, Z. Madeja, K. Burda, T. Sarna, Cell elasticity is an important indicator of the metastatic phenotype of melanoma cells, *Exp Dermatol.* 23 (11) (2015) 813-818, <http://doi.org/10.1111/exd.12535>.
- [9] M. Sarna, M. Krzykawska-Serda, M. Jakubowska, A. Zadło, K. Urbanska, Melanin presence inhibits melanoma cell spread in mice in a unique mechanical fashion, *Sci Rep.* 9 (1) (2019) 9280, <http://doi.org/10.1038/s41598-019-45643-9>.
- [10] M. Picardo, A. T. Slominski, Melanin pigmentation and melanoma, *Exp Dermatol.* (7) (2017) 555-556, <http://doi.org/10.1111/exd.13400>.
- [11] L. Larribère, J. Utikal, Stem cell-derived models of neural crest are essential to understand melanoma progression and therapy resistance, *Front Mol Neurosci.* 12 (2019) 111, <http://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00111>.
- [12] J. Vachtenheim, The many roles of MITF in melanoma, *Single Cell Biol.* 6 (2) (2017) 1000162, <http://doi.org/10.4172/2168-9431.1000162>.

- [13] H. Choi H, H. Choi, J. Han, et al., IL-4 inhibits the melanogenesis of normal human melanocytes through the JAK2-STAT6 signaling pathway, *J Invest Dermatol.* 133 (2) (2013) 528-536, <http://doi.org/10.1038/jid.2012.331>.
- [14] H. R. Hossain, T. M. Ansary, M. Komine, M. Ohtsuki, Diversified stimuli-induced inflammatory pathways cause skin pigmentation, *Int J Mol Sci.* 22 (8) (2021) 3970, <http://doi.org/10.3390/ijms22083970>.
- [15] K. L. Owen, N. K. Brockwell, B. S. Parker, JAK-STAT signaling: a double-edged sword of immune regulation and cancer progression, *Cancers (Basel).* 11 (12) (2019) 2002, <http://doi.org/10.3390/cancers11122002>.
- [16] S. Goenka, M. H. Kaplan, Transcriptional regulation by STAT6, *Immunol Res.* 50 (1) (2011) 87-96, <http://doi.org/10.1007/s12026-011-8205-2>.
- [17] M. Sławińska, J. Lakomy, W. Biernat, et al., STAT3, STAT5A, STAT5B and STAT6 proteins are overexpressed in human basal cell carcinoma, *Clin Exp Dermatol.* 45 (2) (2020) 165-171, <http://doi.org/10.1111/ced.14048>.
- [18] G. Karpathiou, A. Papoudou-Bai, E. Ferrand, J. M. Dumollard, M. Peoc'h, STAT6: a review of a signaling pathway implicated in various diseases with a special emphasis in its usefulness in pathology, *Pathol Res Pract.* 223 (2021) 153477, <http://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153477>.
- [19] S. J. Park, H. Kim, S. H. Kim, E.-H. Joe, I. Jou, Epigenetic downregulation of STAT6 increases HIF-1 α expression via mTOR/S6K/S6, leading to enhanced hypoxic viability of glioma cells, *Acta Neuropathol Commun.* 7 (1) (2019) 149, <http://doi.org/10.1186/s40478-019-0798-z>.
- [20] F. Pan, Q. Wang, S. Li, et al., Prognostic value of key genes of the JAK-STAT signaling pathway in patients with cutaneous melanoma, *Oncol Lett.* 19 (3) (2020) 1928-1946, <http://doi.org/10.3892/ol.2020.11287>.
- [21] M. B. Amin, et al, *AJCC Cancer staging manual. 8th edition.* American Joint Commission on Cancer. Springer, 2017.
- [22] C. M. Balch, A multifactorial analysis of melanoma: prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods, *Ann Surg.* 188 (6) (1978) 732-742, <http://doi.org/10.1097/0000658-197812000-00004>.
- [23] P. Jurmeister, M. Bockmayr, C. Treese, et al., Immunohistochemical analysis of Bcl-2, nuclear S100A4, MITF and Ki67 for risk stratification of early-stage melanoma - A combined IHC score for melanoma risk stratification, *J Dtsch Dermatol Ges.* 17 (8) (2019) 800-808, <http://doi.org/10.1111/ddg.13917>.
- [24] R. Akbani, K. C. Akdemir, B. A. Aksoy, et al., Genomic classification of cutaneous melanoma, *Cell.* 161 (7) (2015) 1681-1696, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044>.

- [25] W. Ji, Y. Liu, B. Xu, et al., Bioinformatics analysis of expression profiles and prognostic values of the signal transducer and activator of transcription family genes in glioma, *Front Genet.* (12) (2021) 625234. <http://doi.org/10.3389/fgene.2021.625234>.
- [26] C. Fu, L. Jiang, S. Hao, et al., Activation of the IL-4/STAT6 signaling pathway promotes lung cancer progression by increasing M2 myeloid cells, *Front Immunol.* 10 (2019) 2638, <http://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02638>.
- [27] J. A. Carlson, J. C. C. Xavier Jr, A. Tarasen, et al., Next-generation sequencing reveals pathway activations and new routes to targeted therapies in cutaneous metastatic melanoma, *Am J Dermatopathol.* 39 (1) (2017) 1-13, <http://doi.org/10.1097/DAD.0000000000000729>.
- [28] A. J. Cochran, Histology and prognosis in malignant melanoma, *J Pathol.* 97 (3) (1969) 459-468, <http://doi.org/10.1002/path.1710970305>.
- [29] G. Paolino, P. Bearzi, R. Pampena, et al., Clinicopathological and dermoscopic features of amelanotic and hypomelanotic melanoma: a retrospective multicentric study, *Int J Dermatol.* (11) (2020) 1371-1380, <http://doi.org/10.1111/ijd.15064>.
- [30] W. Guo, G. Yin, H. Liu, H. Duan, Z. Huang, X. Chen, Matched analysis of the prognosis of amelanotic and pigmented melanoma in head and neck, *Acta Otolaryngol.* 140 (9) (2020) 785-788, <http://doi.org/10.1080/00016489.2020.1763456>.
- [31] D. Ivan D, V. G. Prieto, An update on reporting histopathologic prognostic factors in melanoma, *Arch Pathol Lab Med.* 135 (7) (2011) 825-829, <http://doi.org/10.1043/2010-0229-RAR.1>.
- [32] N. E. Thomas, A. Krickler, W. T. Waxweiler, et al., Comparison of clinicopathologic features and survival of histopathologically amelanotic and pigmented melanomas: a population-based study, *JAMA Dermatol.* 150 (12) (2014) 1306-1314, <http://doi.org/10.1001/jamadermatol.2014.1348>.
- [33] E. Kinnaert, R. Morandini, S. Simon, H. Z. Hill, G. Ghanem, P. Van Houtte, The degree of pigmentation modulates the radiosensitivity of human melanoma cells, *Radiat Res.* 154 (5) (2000) 497-502, [http://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)154\[0497:TDOPMT\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)154[0497:TDOPMT]2.0.CO;2).
- [34] A. A. Brożyna, W. Józwicki, K. Roszkowski, J. Filipiak, A. T. Slominski, Melanin content in melanoma metastases affects the outcome of radiotherapy, *Oncotarget.* 7 (14) (2016) 17844-53, <http://doi.org/10.18632/oncotarget.7528>.

PÊNDICE B – ARTIGO 2

The expression of MITF is associated with the degree of pigmentation and thickness of melanoma

Karina Munhoz de Paula Alves Coelho^{a,b*}, Arthur Fausto Siqueira Simões Júnior^b,
Jaqueline Stall^{a,b}, Paulo Henrique Condeixa de França^a

^a Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, Paulo Malschitzki St, 10, 89219-710, Joinville, Santa Catarina, Brazil.

^b Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos - CEDAP, Mario Lobo St, 61, 89201-330, Joinville, Santa Catarina, Brazil.

* Correspondence to:

Karina Munhoz de Paula Alves Coelho

Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos - CEDAP

Mario Lobo St, 61, 89201-330, Joinville, Santa Catarina, Brazil.

Tel.: +55 047 34229607

Fax: +55 047 34339499

E-mail: karinamunhoz@hotmail.com

Abstract

The *MITF* gene regulates melanin production and the differentiation, proliferation and survival of melanocytes. The gene can be expressed at different levels in distinct melanoma subpopulations. Immunohistochemical expression of MITF is observed in most melanomas and low expression of the gene is generally associated with enhanced invasive and metastatic capacity. The aim of this study was to evaluate the association of immunohistochemical expression of MITF with histopathological features of melanomas. This cross-sectional study analyzed the immunohistochemical expression of MITF in 91 primary melanomas in order to evaluate its association with melanin pigmentation, elastosis, tumor-infiltrating lymphocytes, thickness, mitotic rate, and histological type. Immunohistochemical expression (H-score > 5) of MITF was observed in 86 (94.4%) samples. Three desmoplastic and two nodular melanomas were negative for MITF. Expression of MITF was associated with pigmentation and thickness ($p = 0.007$ and 0.043 , respectively). MITF is expressed in the majority of melanomas and is associated with pigmentation and tumor thickness, indicating its potential use as a prognostic marker.

Keywords: Melanoma, pigmentation, MITF

1. Introduction

Melanoma arises from the rapid proliferation of melanocytes and has a poor prognosis if not treated early [1,2]. Accounting for 90% of skin cancer deaths, melanoma is an extremely resilient neoplasm and no effective therapy exists in the case of metastatic progression [3,4].

Melanomas are usually pigmented and this pigmentation is the result of the presence of melanin in the cell cytoplasm; however, some melanomas can be amelanotic [3]. The presence of melanin in melanoma can affect the invasive and metastatic capacity of this neoplasm and can have potential implications for the therapeutic response [5].

The microphthalmia transcription factor (*MITF*) is one of the key genes responsible for controlling the pigmentation of melanomas [4]. This gene regulates the production of melanin and the differentiation, proliferation and survival of melanocytes [6]. In view of its key role, *MITF* has been termed the “master transcriptional regulator of the melanocyte lineage” [7].

MITF can be expressed at different levels in distinct melanoma subpopulations [8]. High expression of *MITF* is associated with melanoma cells with a proliferative but not with an invasive phenotype. In contrast, melanoma cells with low expression of this transcription factor exhibit enhanced invasive and metastatic capacity [4,9].

MITF is increasingly being used as a marker for the immunohistochemical diagnosis of melanomas since most tumors are reactive in this test [10]. However, some histological types such as desmoplastic and spindle cell melanomas do not exhibit expression of *MITF* [11].

Melanoma is strongly associated with environmental factors and sun exposure is the major risk factor [12]. Solar elastosis is considered the main indicator of the degree of cumulative solar damage. The development of elastosis is inversely related to the amount of pigment in the skin and is directly linked to the intensity and total cumulative time of sun exposure [13].

Therefore, melanomas arising on sun-exposed skin are also classified according to cumulative solar damage, which is assessed in biopsies based on the degree of solar elastosis [14]. Melanomas with low cumulative solar damage include superficial spreading melanomas, while those with high damage include lentigo

maligna and desmoplastic melanomas [3]. Nodular and nevoid melanomas show a variable association with sun exposure [14]. Distinct molecular characteristics are identified in tumors with different degrees of solar damage [3].

Studies indicate that environmental factors such as ultraviolet (UV) radiation stimulate the production of inflammatory factors involved in melanogenesis. IL-4, produced by T lymphocytes present in the tumor microenvironment, inhibits melanogenesis in normal melanocytes by reducing the expression of MITF via the JAK-STAT6 pathway [15].

Lymphocytes present in the tumor microenvironment are a critical component of the immune response to tumors and the presence of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) is correlated with the prognosis of the disease [16]. However, Breslow thickness is recognized as the most important prognostic factor of the clinical behavior of melanomas [17,18]. Another important prognostic factor is the mitotic rate [19]. A larger number of mitoses have been described in amelanotic melanomas irrespective of thickness, suggesting that these melanomas grow more rapidly than pigmented melanomas [20].

The aim of this study was to evaluate the association of the immunohistochemical expression of MITF with histopathological features of melanomas, including pigmentation, histological type, thickness, mitotic rate, TILs, and solar elastosis.

2. Materials and methods

This cross-sectional, retrospective study selected melanoma samples obtained from patients of the municipal public health network and available in the database of a pathological anatomy laboratory. Ninety-one samples of primary melanomas thicker than 1.0 mm and diagnosed from 2011 to 2015 were selected.

Clinicopathological characteristics (sex, age, and anatomical location of the tumor) and tumor-related variables (histological type, thickness, and mitotic rate) were obtained from the anatomopathological records of the laboratory. Based on these data, the anatomopathological stage (tumor-lymph node-metastasis [TNM]) was reclassified according to the 8th edition of the American Joint Committee on

Cancer (AJCC) classification [19]. There was agreement between two pathologists for all diagnoses in the database.

The histological slides of all samples were restained with hematoxylin-eosin and the following variables were analyzed by two observers: TILs, solar elastosis, and pigmentation. Solar elastosis was graded as 0, 1, 2 and 3 according to the WHO Classification of Skin Tumors [14]. TILs were classified as absent, non-brisk, and brisk according to the College of American Pathologists [21]. For histological quantification of melanin, pigmentation was graded visually as present or absent.

Samples fixed in 10% formalin and embedded in paraffin blocks were used for immunohistochemical analysis of MITF expression. A skin area containing normal melanocytes was used as positive control and normal skin keratinocytes served as negative control. The blocks were cut into 4- μ m-thick sections, mounted on silanized histological slides, and left overnight in an oven at 60°C. Next, the slides were incubated in antigen retrieval solution at pH 9.0 (EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x), Dako) for 20 minutes at 95°C using PT-Link (Dako, Glostrup, Denmark). Immunohistochemical staining was performed in an automated system (Autostainer Link 48, Dako) using mouse monoclonal anti-MITF antibody (clone C5D5, CellMarque™ Tissue Diagnosis, Darmstadt, Germany) diluted 1:100. The reaction was developed by incubation with the EnVision FLEX HRP Magenta Substrate Chromogen System (Dako) for 5 minutes. The slides were counterstained with Gill's hematoxylin.

The immunohistochemical expression of MITF was evaluated exclusively in the nucleus of cells. Two observers who were unaware of the clinical data of the patients analyzed the slides. The H-score was determined by multiplying the intensity (0: no staining; 1: weak staining; 2: moderate staining; 3: strong staining) by the respective percentage of stained tumor cells (intervals of 10%), providing values of 0 to 300. Samples with an H-score above the median were classified as positive [22].

The Jamovi 2.2.5 software was used for statistical analysis (<https://www.jamovi.org>). Inter-rater reliability was determined using Cohen's kappa. The chi-squared and Kruskal-Wallis tests were applied to evaluate the association between variables. A p value less than 0.05 was considered to be significant.

The project was approved by the Research Ethics Committee (Approval number 4.037.886) and the study was conducted in accordance with the guidelines of Resolution 466/2012 of the Brazilian National Health Council.

3. Results

For evaluation of the immunohistochemical expression of MITF, 45 (49.5%) samples from male patients and 46 (50.5%) from female patients were analyzed. The mean age was 61 ± 16.3 years. The trunk was the predominant location of melanomas ($n = 39$; 42,9%), followed by the lower limbs ($n = 18$; 19.8%), head and neck ($n = 17$; 18.7%), and upper limbs ($n = 17$; 18.7%). The histological types observed in the sample were superficial spreading ($n = 38$; 41.8%), nodular ($n = 26$; 28.6%), acral lentiginous ($n = 5$; 5.5%), and desmoplastic ($n = 3$; 3.3%) melanomas.

Cohen's kappa test was used for the analysis of inter-rater agreement, which showed perfect agreement for pigmentation ($k = 1.0$), substantial agreement for TILs and MITF ($k = 0.698$ and $k = 0.654$, respectively), and moderate agreement for elastosis ($k = 0.482$).

Immunohistochemical expression (H-score > 5) of MITF was detected in 86 (94.5%) samples. Three desmoplastic and two nodular melanomas were negative for MITF. The median expression score of MITF was 160. Table 1 shows the association of MITF expression with the presence of pigmentation in melanoma, histological type, solar elastosis, TILs, mitotic rate, and thickness. The immunohistochemical expression of MITF in normal skin and melanoma samples is shown in Figure 1.

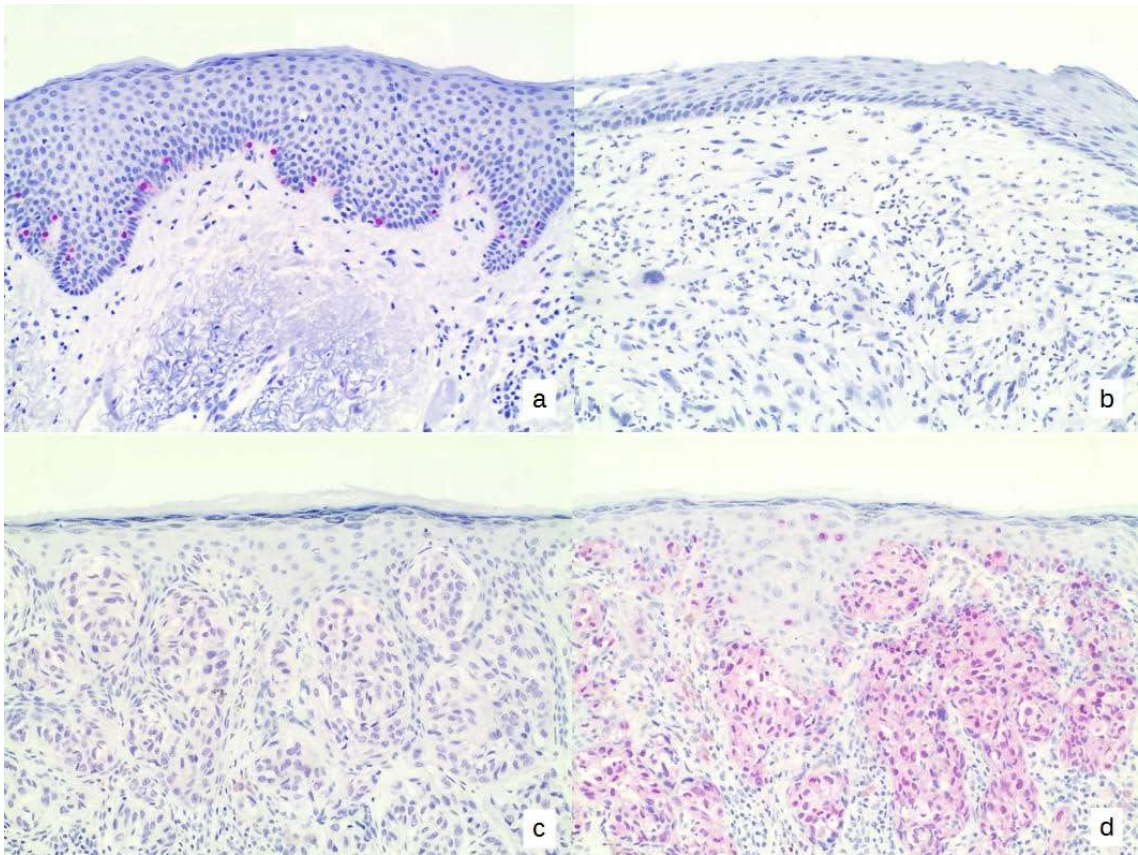


Figure 1. Immunohistochemical expression of MITF: a) normal skin showing expression in normal melanocytes and absence of expression in keratinocytes, b) melanoma with absent expression, c) melanoma with an expression score ≤ 160 , and d) melanoma with an expression score > 160 . Magnification: 200x

Table 1. Association between the immunohistochemical expression of MITF in primary melanomas and clinicopathological variables.

Variable	Cases, n	Immunohistochemical expression of MITF, n (%)		p
		> 160 (n = 45)	≤ 160 (n = 46)	
Pigmentation				
Present	70	40 (88.9)	30 (65.2)	0.007
Absent	21	5 (11.1)	16 (34.8)	
Histological type				
Nodular	45	19 (42.2)	26 (56.5)	0.337
Superficial spreading	38	23 (51.1)	15 (32.6)	
Acral lentiginous	5	3 (6.7)	2 (4.4)	
Desmoplastic	3	0 (0)	3 (6.5)	
Solar elastosis				
0	21	10 (22.2)	11 (23.9)	0.483
1	32	18 (40.0)	14 (30.4)	
2	23	12 (26.7)	11 (23.9)	
3	15	5 (11.1)	10 (21.8)	
TILs				
Absent	3	2 (4.4)	1 (2.2)	0.800
Brisk	31	14 (31.1)	17 (36.9)	
Non-brisk	57	29 (64.4)	28 (60.9)	
Mitotic rate				
≥ 1	88	43 (95.6)	45 (97.8)	0.544
< 1	3	2 (4.4)	1 (2.2)	
Thickness (mm)				
> 1.0 – 2.0	29	18 (40.0)	11 (23.9)	0.043
> 2.0 – 4.0	19	11 (24.4)	8 (17.4)	
> 4.0	43	16 (35.6)	27 (58.7)	

TILs: tumor-infiltrating lymphocytes.

4. Discussion

In the present study, immunohistochemical expression of MITF was detected in the majority of tumors analyzed (86 cases, 94.5%), except for two nodular and three desmoplastic melanomas. Immunohistochemical expression of MITF is known to occur in most melanomas, while a high proportion of desmoplastic and spindle cell melanomas are negative for this marker [11]. Beleaua et al. (2021) identified the immunohistochemical expression of MITF in 80 of 105 melanoma cases. Among melanomas that did not express MITF, 18/58 were nodular melanomas, 4/14 were superficial spreading melanomas, and 3/8 were lentiginous melanomas [23].

In our study that included melanomas with a Breslow thickness greater than 1.0 mm, we observed a difference in MITF expression according to tumor thickness ($p = 0.043$). One study identified immunohistochemical expression of MITF in all melanomas ≤ 1.0 mm and in 70% of melanomas > 1.0 mm [24]. Another study that evaluated the relationship between the immunohistochemical expression of MITF and survival in intermediate-thickness melanomas (1.0 to 4.0 mm) found positive MITF staining in 82.5% of cases. Overall survival was 80.89 ± 17.98 months for melanomas that did not express MITF and 187.90 ± 13.41 months for melanomas that did ($p = 0.0086$) [25]. In the study by Naffouje et al. (2015), immunohistochemical expression of MITF was directly associated with overall survival, with survival of 66.75 ± 38.17 months for MITF-positive tumors and 38.17 ± 5.18 months for negative tumors.

Patients showing immunohistochemical expression of MITF $> 50\%$ in primary melanomas have been reported to have fewer nodal metastases than those with expression $< 50\%$ ($p = 0.04$). Thus, MITF expression in primary cutaneous melanomas may be a useful tool for assessing lymph node status [25,26]. Increased expression of MITF in patients with melanomas gives rise to more differentiated tumors, with a consequent reduction in nodal metastases and better survival [26]. However, MITF has also been reported to exert pro-survival functions in melanoma cells exposed to radiotherapy and chemotherapy. Furthermore, at high levels, MITF protects melanoma cells against the cytotoxicity of mitogen-activated protein kinase (MEK) inhibitors [8,27].

We identified a significant difference ($p = 0.007$) in MITF expression between pigmented and non-pigmented melanomas. Cutaneous responses to different stimuli, including UV radiation, induce the production of inflammatory cytokines that act on melanocytes, with consequent changes in pigmentation [15]. However, we found no association between MITF expression and solar elastosis or TILs. This lack of an association may be due to the small number of samples analyzed, which is the main limitation of our study.

In conclusion, the present study demonstrated that MITF is expressed in the majority of melanomas and is associated with melanin pigmentation and tumor thickness and stage, indicating its potential use as a prognostic marker.

REFERENCES

- [1] R. L. Pearlman, et al, Potential therapeutic targets of epithelial-mesenchymal transition in melanoma, *Cancer Lett.* 391 (2017) 125-140. doi: 10.1016/j.canlet.2017.01.029.
- [2] A. Sample, Y. Y. He, Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma, *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 34 (1) (2018) 13-24. doi: 10.1111/phpp.12329.
- [3] C. Garbe, et al, European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics - Update 2019, *Eur J Cancer* 126 (2020) 141-158. doi: 10.1016/j.ejca.2019.11.014.
- [4] J. Vachtenheim, The many roles of MITF in melanoma, *Single Cell Biol.* 6 (2) (2017) 1000162. doi: 10.4172/2168-9431.1000162.
- [5] R. M. Slominski, et al, The role of melanin pigment in melanoma, *Exp Dermatol.* 24 (4) (2015) 258-259. doi: 10.1111/exd.12618.
- [6] T. Pillaiyar, et al, Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis, *Cell Signal.* 40 (2017) 99-115. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.09.004.
- [7] A. Kawakami, D. E. Fisher, The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology, *Lab Invest.* 97 (6) (2017) 649-656. doi: 10.1038/labinvest.2017.9
- [8] M. L. Hartman, C. M. Cysz, Pro-survival role of MITF in melanoma, *J Invest Dermatol.* 135 (2) (2015) 352-358. doi: 10.1038/jid.2014.319.
- [9] A. Swoboda, et al, STAT3 promotes melanoma metastasis by CEBP-induced repression of the MITF pathway, *Oncogene* 40 (6) (2021) 1091-1105. doi: 10.1038/s41388-020-01584-6.
- [10] E. Saliba, J. Bhawan, Aberrant expression of immunohistochemical markers in malignant melanoma: a review, *Dermatopathology (Basel)* 8 (3) (2021) 359-370. doi: 10.3390/dermatopathology8030040.
- [11] T. Feringer, Immunohistochemistry in dermatopathology, *Arch Pathol Lab Med.* 139 (1) (2015) 83-105. doi: 10.5858/arpa.2014-0075-RA.
- [12] H. W. Higgins, et al, Melanoma in situ: Part I. Epidemiology, screening, and clinical features, *J Am Acad Dermatol.* 73 (2) (2015) 181-90, quiz 191-192. doi: 10.1016/j.jaad.2015.04.014.
- [13] J. S. Moon, C. H. Oh, Solar damage in skin tumors: quantification of elastotic material, *Dermatology* 202 (4) (2001) 289-292. doi: 10.1159/000051660.

- [14] World Health Organization, WHO classification of skin tumors. World Health Organization of Tumors, 4th ed, vol. 11, Lyon France: 2018.
- [15] M. R. Hossain, et al, Diversified stimuli-induced inflammatory pathways cause skin pigmentation, *Int J Mol Sci.* 22 (8) (2021) 3970. doi: 10.3390/ijms22083970.
- [16] M. C. Mihm Jr, J. J. Mulé, Reflections on the histopathology of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma and the host immune response, *Cancer Immunol Res.* 3 (8) (2015) 827-835. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0143.
- [17] A. E. Acosta, et al, Melanoma: pathogenesis, clinic and histopathology, *Rev Asoc Colomb Dermatol Cir Dermatol.* 17 (2) (2009).
- [18] D. Ivan, V. G. Prieto, An update on reporting histopathologic prognostic factors in melanoma, *Arch Pathol Lab Med.* 135 (7) (2011) 825-829. doi: 10.1043/2010-0229-RAR.1.
- [19] M. B. Amin, et al, AJCC Cancer staging manual, 8th edition, American Joint Commission on Cancer. Springer, 2017.
- [20] N. E. Thomas, A. Kricke, W. T. Waxweiler, et al., Comparison of clinicopathologic features and survival of histopathologically amelanotic and pigmented melanomas: a population-based study, *JAMA Dermatol.* 150 (12) (2014) 1306-1314. doi:10.1001/jamadermatol.2014.1348.
- [21] College of American Pathologists, Protocol for the examination of specimens from patients with melanoma of the skin. CAP, Version: Melanoma 4.0.1.0, 2017.
- [22] P. Jurmeister, et al, Immunohistochemical analysis of Bcl-2, nuclear S100A4, MITF and Ki67 for risk stratification of early-stage melanoma - A combined IHC score for melanoma risk stratification, *J Dtsch Dermatol Ges.* 17 (8) (2019) 800-808. doi: 10.1111/ddg.13917.
- [23] M. A. Beleaua, et al, SOX11, SOX10 and MITF gene interaction: a possible diagnostic tool in malignant melanoma, *Life (Basel)* 11 (4) (2021) 281. doi: 10.3390/life11040281.
- [24] L. Zhuang, et al, Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma, *Mod Pathol.* 20 (4) (2007) 416-426. doi: 10.1038/modpathol.3800750.
- [25] G. I. Salti, Microphthalmia transcription factor: a new prognostic marker in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma, *Cancer Res.* 60 (18) (2000) 5012-5016.
- [26] S. Naffouje, et al, Microphthalmia transcription factor in malignant melanoma predicts occult sentinel lymph node metastases and survival. *Melanoma Res.* 25 (6) (2015) 496-502. doi: 10.1097/CMR.000000000000195.

[27] M. Mendonça Sanches, et al, Genes and melanoma, SPDV (3) (2018) 231-238.
doi: 10.29021/spdv.75.3.8

APÊNDICES

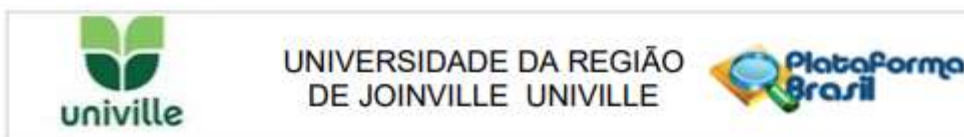
APÊNDICE C – Tabela de dados

As tabelas, em formato excel, com os dados deste estudo estão disponíveis no Google Drive e podem ser acessadas através do link:

https://drive.google.com/drive/folders/1SQIFJrVs-weKY5cK4t_nJHOQ2HuSZbbe?usp=sharing

ANEXOS

ANEXO I - Parecer consubstanciado do comitê de ética- UNIVILLE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da expressão dos genes STAT6 e MITF por imuno-histoquímica em melanomas

Pesquisador: Karina Munhoz de Paula Alves Coelho

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43396921.5.0000.5366

Instituição Proponente: FUNDACAO EDUCACIONAL DA REGIAO DE JOINVILLE - UNIVILLE

Patrocinador Principal: CENTRO DE DIAGNOSTICOS ANATOMO PATOLOGICOS LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.593.815

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto, Objetivo da Pesquisa e Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas dos arquivos "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1690913.pdf" e "Projeto_de_pesquisa_detalhado" a partir das informações inseridas pelo Pesquisador Responsável do estudo na Plataforma Brasil em 05/02/2021.

Resumo:

Melanoma é uma neoplasia maligna, agressiva, que tem forte associação com fatores ambientais, sendo a exposição solar o maior fator de risco. Sua frequência está aumentando em muitos países e, no Brasil, as maiores taxas encontram-se na Região Sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). A prevalência na região de Joinville – Santa Catarina é alta e está associada, além da exposição à radiação solar, aos fototipos I e II, prevalentes nesta região (STEGLICH, 2018). O valor prognóstico da melanina nos melanomas é controverso. Alguns estudos não encontraram associações significativas entre a pigmentação dos melanomas e o prognóstico. No entanto, outros referem que a melanina é responsável por propriedades mecânicas das células de melanoma e que pode inibir o processo de metástase (SARNA, 2018). A capacidade de metastatizar tem sido associada a baixa expressão do fator de transcrição de microftalmia (MITF) que é um dos genes responsáveis pelo controle da pigmentação (VACHTENHEIM, 2017). A melanogênese também é

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, nº 10. Bloco B, Sala 119. campus Bom Retiro
Bairro: Zona Industrial **CEP:** 89.219-710
UF: SC **Município:** JOINVILLE
Telefone: (47)3461-9235 **E-mail:** comitetica@univille.br



Continuação do Parecer: 4.593.815

regulada pela expressão de genes da via de Janusquinase2

- transdutor de sinal e ativador da transcrição-6 (JAK2-STAT6) através da interleucina 4 (IL-4), que é uma citocina produzida pelos linfócitos T CD4. Porém, poucos estudos estão disponíveis sobre o valor prognóstico dos genes da via JAK-STAT no melanoma cutâneo (PAN, 2020).

Hipótese:

A expressão dos genes STAT6 e MITF se relaciona com a pigmentação dos melanomas.

Metodologia Proposta:

TIPO DE ESTUDO E QUESTÕES ÉTICAS

Trata-se de um estudo observacional do tipo caso-controle. O estudo será desenvolvido segundo os requisitos das Resoluções 466/2012 e 340/2004 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde. Toda a publicação ou divulgação dos resultados será realizada sem a identificação dos participantes. A identidade de cada indivíduo será mantida em sigilo.

SELEÇÃO DA AMOSTRA E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Serão incluídas no estudo amostras com os seguintes diagnósticos: melanomas, melanomas metastáticos. As amostras serão provenientes do Centro de Diagnósticos Anátomo-patológicos (CEDAP), de Joinville – SC – Brasil, do período de janeiro de 2011 a dezembro de 2020. As informações a respeito de mortalidade serão obtidas no próprio banco de dados de CEDAP e quando necessário, de registros nos prontuários médicos ou do Sistema Nacional de Mortalidade.

Serão estudadas 250 amostras que serão identificadas conforme o número de cadastro do CEDAP. As amostras serão reavaliadas conforme a qualidade da coloração e aquelas que não estiverem preservadas serão novamente coradas pela coloração de hematoxilina eosina (H&E). Os casos serão reanalisados por patologistas. A reavaliação das lesões será realizada de acordo com os critérios descritos na classificação de tumores cutâneos da Organização Mundial de Saúde (OMS). Não serão incluídas na análise, os casos em que a quantidade de material presente no bloco de parafina for insuficiente para as análises e/ou que represente risco de consumo total do tecido presente no bloco de parafina, impossibilitando eventuais análises futuras.

Os seguintes critérios clínico-patológicos serão reavaliados: localização, idade, gênero, estadiamento anatomopatológico, tipo histológico, índice Breslow, ulceração, dano actínico e pigmentação da lesão. Na sequência as amostras serão submetidas a análises moleculares, através da técnica de imuno-histoquímica (IHQ).

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, n° 10. Bloco B, Sala 119. campus Bom Refiro

Bairro: Zona Industrial

CEP: 89.219-710

UF: SC

Município: JOINVILLE

Telefone: (47)3461-9235

E-mail: comitetica@univille.br

Continuação do Parecer: 4.593.815

TÉCNICAS DE ANÁLISE

As reações serão realizadas a partir dos blocos de parafina que estão sob guarda CEDAP, não sendo necessária uma coleta específica para o estudo. Para as análises de imunoistoquímica serão realizados novos cortes de 3 micras que serão depositados em lâminas. Os anticorpos utilizados serão da Agilent. A amostra sofrerá recuperação antigênica. Estas análises serão realizadas no CEDAP. Portanto, não será necessária uma coleta de material específica para o estudo, não se impondo desta forma riscos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a expressão imuno-histoquímica dos genes STAT6 e MITF em melanomas em correlação com a pigmentação.

Objetivo Secundário:

Investigar a expressão dos genes STAT6 e MITF em relação à elastose solar nos melanomas.

Investigar a expressão dos genes STAT6 e MITF em relação aos linfócitos infiltrantes de tumor nos melanomas.

Investigar expressão dos genes STAT6 e MITF em relação ao estadiamento patológico TNM nos melanomas.

Analisar a presença de pigmento de melanina em relação às variáveis clínicas e histológicas: idade, gênero, localização anatômica, tempo de sobrevida, metástase em linfonodos, tipo histológico, elastose solar, linfócitos infiltrantes de tumor, índice de Breslow, ulceração e estadiamento patológico TNM nos melanomas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Serão analisadas lâminas e material proveniente de blocos de parafina, cuja amostra clínica foi solicitada por indicação médica. Desta forma este estudo não oferecerá riscos físicos aos pacientes, pois não serão realizadas coletas específicas. O estudo não acarretará custos adicionais ao sistema público.

Todos os dados e resultados obtidos para os fins específicos da pesquisa permanecerão sob posse e guarda dos pesquisadores por, no mínimo, cinco anos após sua conclusão. Após esse período, todos os dados serão apropriadamente mantidos ou destruídos pelo pesquisador, sendo sempre

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, n° 10. Bloco B, Sala 119, campus Bom Retiro

Bairro: Zona Industrial

CEP: 89.219-710

UF: SC

Município: JOINVILLE

Telefone: (47)3461-9235

E-mail: comitetica@univille.br



UNIVERSIDADE DA REGIÃO
DE JOINVILLE UNIVILLE



Continuação do Parecer: 4.593.815

mantido o compromisso com o sigilo e a confidencialidade. Todas as divulgações dos resultados advindos da pesquisa não conterão o nome ou

quaisquer dados pessoais que permitam a identificação do participante. Portanto, considera-se minimizada a possibilidade de quebra da confidencialidade dos participantes.

Todos os procedimentos laboratoriais serão realizados conforme normas de biossegurança. Os manipuladores estarão equipados com equipamentos de proteção individual e coletiva.

Benefícios:

Espera-se encontrar diferença na expressão dos genes STAT6 e MITF e como consequência contribuir para o melhor entendimento do prognóstico e da resposta terapêutica dos melanomas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma tese de doutorado. A pesquisa será realizada no Laboratório CEDAP, detentor das 250 amostras de material proveniente de casos diagnosticados de melanoma e melanoma metastático.

O início das análises está previsto para o período de 01/03/2021 a 31/03/2021 e a pesquisa será encerrada em 28/02/2022. A pesquisadora ressalta que os procedimentos metodológicos previstos somente serão realizados após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Orçamento detalhado da pesquisa prevê custeio de R\$ 6.130,00 que serão viabilizados através de recursos financeiros do CEDAP e dos projetos de pesquisa vinculados ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente, sob responsabilidade do orientador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Pesquisadora solicita dispensa do TCLE com a seguinte justificativa: "O acesso às informações clínicas e aos dados diagnósticos acontecerá com autorização expressa do responsável pelo laboratório e exclusivamente para os fins previstos na pesquisa. Portanto, considera-se minimizada a possibilidade de quebra de confidencialidade do participante. Ainda, dado o fato de que melanomas são doenças agressivas e com alta mortalidade, a busca pelo consentimento individual do responsável poderia gerar desconforto ao rememorar a dor da perda aos familiares e/ou responsáveis sem haver qualquer expectativa de benefício direto proveniente da pesquisa. Considerando-se o exposto acima - improvável perda de sigilo e quebra de confidencialidade e a busca por evitar gerar desconforto aos familiares/responsáveis - solicita-se a dispensa de proposição e aplicação de Termo de

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, nº 10, Bloco B, Sala 119, campus Bom Retiro
Bairro: Zona Industrial **CEP:** 89.219-710
UF: SC **Município:** JOINVILLE
Telefone: (47)3461-9235 **E-mail:** comitetica@univille.br

Página 04 de 06



UNIVERSIDADE DA REGIÃO
DE JOINVILLE UNIVILLE



Continuação do Parecer: 4.593.815

enquadramento do protocolo, estão disponíveis na página. Segue o link de acesso <http://www.univille.edu.br/status-parecer/645062>

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade da Região de Joinville - Univille, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1690913.pdf	05/02/2021 20:16:47		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_detalhado.docx	05/02/2021 20:16:21	Karina Munhoz de Paula Alves Coelho	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	04/02/2021 19:03:15	Karina Munhoz de Paula Alves Coelho	Aceito
Outros	TSUD.pdf	29/01/2021 20:28:34	Karina Munhoz de Paula Alves Coelho	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia.pdf	29/01/2021 20:28:15	Karina Munhoz de Paula Alves Coelho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOINVILLE, 16 de Março de 2021

Assinado por:
Marcia Luciane Lange Silveira
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, nº 10. Bloco B, Sala 119. campus Bom Retiro
Bairro: Zona Industrial **CEP:** 89.219-710
UF: SC **Município:** JOINVILLE
Telefone: (47)3461-9235 **E-mail:** comiteca@univille.br

ANEXO II – Comprovantes de submissão dos artigos à revista Pathology – Research and Practice

PRP-D-23-00416 - Confirming your submission to Pathology - Research and Practice

Pathology - Research and Practice <em@editorialmanager.com>
Responder a: Pathology - Research and Practice <support@elsevier.com>
Para: Karina Munhoz de Paula Alves Coelho <karinamunhoz@gmail.com>

16 de fevereiro de 2023 às 19:05



This is an automated message.

STAT6 expression is associated with the degree of pigmentation in melanomas

Dear Dr Coelho,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Pathology - Research and Practice. It has been assigned the following manuscript number: PRP-D-23-00416.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/prp/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Pathology - Research and Practice

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, then you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. For more details see the journal guide for authors.

#AU_PRP#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code



PRP-D-23-00709 - Confirming your submission to Pathology - Research and Practice

Pathology - Research and Practice <em@editorialmanager.com>
Reply-To: Pathology - Research and Practice <support@elsevier.com>
To: Karina Munhoz de Paula Alves Coelho <karinamunhoz@gmail.com>

Sun, 19 Mar 20:58

This is an automated message.

The expression of MITF is associated with the degree of pigmentation and thickness of melanoma

Dear Dr Coelho,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Pathology - Research and Practice. It has been assigned the following manuscript number: PRP-D-23-00709.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/prp/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Pathology - Research and Practice

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, then you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. For more details see the journal guide for authors.

#AU_PRP#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) a disponibilizar em ambiente digital institucional, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/IBICT) e/ou outras bases de dados científicas, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto integral da obra abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data 12/06/2023.

1. Identificação do material bibliográfico: Tese () Dissertação () Trabalho de Conclusão

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor: KARINA MUNHOZ DE PAULA ALVES COELHO

Orientador: PAULO HENRIQUE C. DE FRANÇA Coorientador: _____

Data de Defesa: 13/05/2022

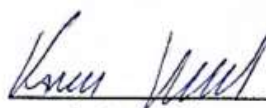
Título: ANÁLISE DA PIGMENTAÇÃO POR MELANINA E DA EXPRESSÃO DE SMYD6 E MITF EM MELANOMAS CUTÂNEOS

Instituição de Defesa: UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE

3. Informação de acesso ao documento:

Pode ser liberado para publicação integral Sim () Não

Havendo concordância com a publicação eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese, dissertação ou relatório técnico.


Assinatura do autor

Joinville/12/06/2023
Local/Data