



## Densidade microvascular estimada pela endogлина em nevos melanocíticos cutâneos e melanomas malignos cutâneos humanos

Andréia Brito Souza, Valéria Couto Quintão, Erivelton Pereira Santos, Camila Santos Pereira, Ludmilla Regina de Souza, Marcos Vinícius Macedo de Oliveira, Alfredo Maurício Batista de Paula

### Introdução

O melanoma maligno cutâneo (MMC) é um dos cânceres de pele humana mais agressivo que resulta de uma complexa interação entre fatores endógenos e exógenos [1]. Dados recentes mostraram que a taxa de incidência para MMC continuam a subir, especialmente entre os jovens. Embora MMC representem menos de 10% de todos os cânceres de pele, é responsável por mais de 90% das mortes por câncer de pele. Durante os estágios iniciais da progressão do MMC, pode haver a proliferação benigna de melanócitos a partir do desenvolvimento de nevos melanocíticos cutâneos (NMC) [2].

Vários estudos têm mostrado que a quantificação da densidade dos microvasos em tumores (DMV) representa uma avaliação de confiança da angiogênese tumoral e parece desempenhar um papel fundamental na progressão do tumor e, como um fator de prognóstico de tumores sólidos humanos [3]. No entanto, a participação destas alterações vasculares em neoplasias melanocíticas cutâneas benignas e malignas permanece inconclusiva. A endogлина (CD105) é um componente transmembranar da glicoproteína fosforilada associada à proliferação e hipóxia induzida do complexo do receptor de fator de crescimento transformante-beta (TGF- $\beta$ ). Notavelmente, endogлина é preferencialmente expressa nas células endoteliais proliferativas ativas, e que tem um papel essencial para o desenvolvimento vascular [4,5]. Ela promove a migração e uma rotação rápida de células endoteliais, estimulando a via de fosforilação do TGF- $\beta$  / LFA-1 / Smad5, enquanto que inibe a via de sinalização do TGF- $\beta$  / ALK-5 / Smad2-3 [6].

Este estudo objetivou analisar a DMV realizada pela expressão imuno-histoquímica de endogлина em amostras de nevos melanocíticos cutâneos e melanoma maligno cutâneo. Ainda assim, foi analisada a expressão de endogлина de acordo com fatores clínico do MMC.

### Material e Método

#### A. Amostras de tecido e pacientes

Este estudo retrospectivo e transversal foi realizado em blocos de tecido arquivado de lesões primárias ressecadas cirurgicamente de 26 pacientes com NMC (média de idade:  $33,2 \pm 12,5$  anos de idade, relação masculino: feminino: 1: 2,25, cor da pele branca: 14 / 53,8%) e 44 com MMC (idade média:  $55 \pm 14,9$  anos, relação masculino: feminino: 1: 1,93, cor da pele branca: 21 / 87,5%). Dados sócio demográficos e clínico-patológicos foram obtidos a partir de prontuários médicos do centro de saúde de Oncologia na cidade de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

Para a análise morfológica, todas as amostras foram fixados em formalina e embebidos em parafina. Seções 3-5 $\mu$ m de espessura foram retirado de amostras e corado com hematoxilina e eosina para análise morfológica. A análise morfológica de Breslow [7] analisa a espessura da lesão do MMC classificando-os em: TI (até 0,75 milímetros, n = 3, 6,8%), TII (a partir de 0,75 a 1,5 mm, n = 7, 15,9%), TIII (1,5 a 3 mm, n = 27, 61,4%), e TIV (3 a 4 mm, n = 7, 15,9%) (40). A análise patológica dos níveis de Clark (grau de invasão): são categorizadas em: I, lesões intraepidérmicas e epitélio anaxial nível; nível II, invasão até a derme papilar; nível III, preenche toda a derme reticular, porém sem invadi-lo; nível IV, invasão da derme reticular; e nível V, a invasão da hipoderme [8].

#### B. Reações de imuno-histoquímica

Expressões com endogлина foi obtido usando o método de imuno-histoquímica com sistema de detecção estreptavidina-biotina-peroxidase. Seções 4 $\mu$ m de espessura dos NMC e dos MMC foram desparafinizadas em xilol e reidratados em uma série de etanol descendente. Os cortes foram submetidos à técnica de recuperação antigênica combinado com panela de pressão. Em seguida, a peroxidase endógena, biotina, e estreptavidina foram bloqueadas por utilização de reagentes específicos, antes de incubação com cada anticorpo primário (anticorpo policlonal de coelho anti-CD105, 1:100), durante a noite a 4°C. As seções foram em seguida incubadas com LSAB-Kit (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) durante 1 h. Os tecidos foram marcadas com 3,3-diaminobenzidina cromógeno, contrastado com hematoxilina de Mayer, e visualizados em microscópio óptico. Os controles positivos e negativos foram aplicados de



Aprovado pelo Comitê de Ética local (691.408/2014)  
acordo com as instruções do fabricante.

### Análises estatísticas

Todos os dados investigados foram analisados no software estatístico SPSS® 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) pelo teste t de Student. O valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## Resultados e Discussão

Expressão imunohistoquímica de endogлина mostrou reatividade seletiva para células endoteliais e estruturas vasculares nomeadamente localizadas em áreas de estroma peritumoral de nevos melanocíticos e melanoma cutâneo maligno cutâneo. Constatou-se diferenças estatisticamente significativas na análise de DMV da endogлина em lesões de NMC e MMC ( $p < 0.001$ ). Mostrou-se um aumento da expressão da endogлина em amostras de MMC (média  $\pm$  DP =  $1,27 \pm 0,45$ ) em comparação com NMC (média  $\pm$  DP =  $0,82 \pm 0,22$ ).

A endogлина é considerada o marcador mais confiável para identificar células endoteliais proliferando ativamente, e, portanto, a neovascularização [5,6]. Semelhante ao encontrado em outros estudos [9], observamos que o MMC exibiu uma DMV elevada em comparação com as amostras do NMC. De acordo com os nossos resultados, uma maior imunodeteção de endogлина em amostras de MMC sugere que as células de melanoma, extremamente ativas, podem contribuir para aumentar a atividade proliferativa de células endoteliais e, assim, aumentando a rede vascular no estroma peritumoral, a fim de permitir o desenvolvimento células de melanoma com alta demanda metabólica, bem como disponibilizar novas vias de disseminação tumoral [10].

## Conclusão

Em conclusão, o MMC apresentou uma DMV superior em comparação com a variante benigna cutânea de neoplasia melanocítica (NMC). A alta de DMV, determinada pela expressão da endogлина, parece contribuir para a progressão da lesão neoplásica melanocítica.

## Referências

- [1] CHUNG, C.Y. *et al.* **Melanoma prevention using topical PBISe**. Cancer Prev Res (Phila). 2011 Jun;4(6):935-48. PubMed PMID: 21367959. Pubmed Central PMCID: 3493621.
- [2] TUCKER, M.A. *et al.* **A natural history of melanomas and dysplastic nevi: an atlas of lesions in melanoma-prone families**. Cancer. 2002 Jun 15;94(12):3192-209. PubMed PMID: 12115352.
- [3] FOX, S.B. **Tumour angiogenesis and prognosis**. Histopathology. 1997 3/1997;30(3):294-301.
- [4] SHE, X. *et al.* **Synergy between anti-endogлина (CD105) monoclonal antibodies and TGF-beta in suppression of growth of human endothelial cells**. Int J Cancer. 2004 Jan 10;108(2):251-7. PubMed PMID: 14639611.
- [5] FONSATTI, E.; Maio, M. **Highlights on endogлина (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer**. J Transl Med. 2004 Jun 11;2(1):18. PubMed PMID: 15193152. Pubmed Central PMCID: 441416.
- [6] NASSIRI, F. *et al.* **Endogлина (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy**. Anticancer Res. 2011 Jun;31(6):2283-90. PubMed PMID: 21737653.
- [7] BRESLOW, A. **Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma**. Ann Surg. 1970 Nov;172(5):902-8. PubMed PMID: 5477666. Pubmed Central PMCID: 1397358.
- [8] CLARK, W.H. *et al.* **The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin**. Cancer Res. 1969 Mar;29(3):705-27. PubMed PMID: 5773814. Epub 1969/03/01. Eng
- [9] BARNHILL, R.L. *et al.* **Angiogenesis and tumor progression of melanoma. Quantification of vascularity in melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma**. Lab Invest. 1992 Sep;67(3):331-7. PubMed PMID: 1383607.
- [10] MICHAYLIRA, C.Z; Nakagawa, H. **Hypoxic microenvironment as a cradle for melanoma development and progression**. Cancer Biol Ther. 2006 May;5(5):476-9. PubMed PMID: 16627974.