



## **Análise Clinicopatológica e Imunohistoquímica da Densidade Microvascular Estimada pelo Endoglina em Melanoma Maligno Cutâneo**

Jhosiffer Bryan Pereira dos Santos, Valéria Couto Quintão, Andréia Brito Souza, Erivelton Pereira Santos, 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 humanos mais agressivos, que resulta de uma complexa interação entre fatores endógenos e exógenos [1,2]. Dados recentes mostraram que a taxa de incidência para MMC continuam a subir, especialmente entre os jovens [3,4].

No desenvolvimento tumoral ocorre um aumento da atividade angiogênica em células endoteliais induzidas por fatores angiogênicos de sinalização. A endoglina é um componente transmembranar da glicoproteína fosforilada associada à proliferação do complexo do receptor de fator de crescimento transformante-beta (TGF- $\beta$ ). Notavelmente, endoglina é preferencialmente expressa nas células endoteliais proliferativas ativas, e que tem um papel essencial para o desenvolvimento vascular [5-6]. A endoglina promove a migração rápida de células endoteliais, estimulando a via de fosforilação do TGF- $\beta$  / LFA-1 / Smad5, enquanto que inibe a via do TGF- $\beta$  / ALK-5 / Smad2-3 [7,8]. No presente estudo, procurou-se analisar a densidade microvascular identificada pela expressão de endoglina em amostras de MMC investigando associações com fatores clinicopatológicos da doença.

### **Material e métodos**

#### *A. Coleta de amostra de melanoma*

Este estudo foi realizado em tecido arquivado de 44 lesões primárias de MMC ressecadas cirurgicamente.

#### *B. Análises clinicopatológicas*

O estadiamento clínico TNM I/II foi observado em 9 (20,5%) casos, e nos estágios III/IV foram observados 35 (79,5%) amostras de MMC. As seguintes formas clínicas foram identificadas: melanoma expansivo superficial (n = 18, 40,9%); nodular (n = 7, 15,9%), melanoma lentigo maligno (n = 10, 22,7%), e melanoma lentiginoso acral (n = 9, 20,5%). Ulceração do tumor primário foi detectado em seis (13,6%) e recidiva em 10 (14,3%) lesões primárias de MMC. Os locais anatómicos de lesões MMC foram classificados das seguintes formas: baixo risco (menor tronco, coxa, perna, pé, membros inferiores, mãos e rosto, n = 28, 63,6%); e de alto risco (costas e peito, braço, pescoço e couro cabeludo; n = 16, 38,4%). Ausência de metástase foi notada em 15 pacientes com MMC. Porém, outro grupo com 29 pacientes com MMC apresentaram simultaneamente local e metástase distante no momento do diagnóstico.

Para a análise morfológica, todas as amostras de tecido MMC foram fixadas em formol e embebidas em parafina. Seções 3-5 $\mu$ m espessura foram retiradas das amostras e corados com hematoxilina e eosina para análise morfológica. As amostras de CMM foram analisadas morfológicamente segundo as espessuras de Breslow: 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%). Também foram classificadas segundo os níveis de invasão de Clark: Nível I, lesões intra-epidérmicas e epitélio anexial 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.

#### *C. Reações de Imunohistoquímica*

A expressão de endoglina foi analisada a partir do método de imunohistoquímica com sistema de detecção estreptavidina-biotina peroxidase. Seções 4 $\mu$ m de espessura do MMC foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em uma série de etanol descendente. Os cortes foram submetidos à recuperação antigênica com panela de pressão à 121°C por 10 minutos. Em seguida, a peroxidase endógena, biotina e estreptavidina foram bloqueadas por utilização de reagentes específicos, antes de incubação com anticorpo primário (anticorpo policlonal de coelho anti-endoglina, 1:100; Abcam), overnight a 4°C. As seções foram em seguida incubadas com Kit LSAB® (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), durante 1 h. Os tecidos foram marcadas com 3,3-diaminobenzidina, cromogêneo, contrastado com



hematoxilina de Mayer, e visualizados em microscópio óptico. Os controles positivos e negativos foram aplicados de acordo com as instruções do fabricante. Para as análises DMV, a amostra foi inspecionada em baixa ampliação microscópica. Os microvasos foram identificados como células endoteliais coradas. A DMV foi estimada pela endogлина com a avaliação cinco áreas de alta marcação vascular intratumoral ("hot spots"). Cada hot spot foi avaliado em três áreas de maior aumento (400x), para um total de 15 campos, estabelecendo-se a DMV tumoral [9].

#### D. Análises estatísticas

Todos os dados investigados analisados no software SPSS® 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Houve distribuição paramétrica dos dados de DMV, sendo usado o teste T de Student nas análises estatísticas. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### Resultados

A endogлина mostrou reatividade seletiva para células endoteliais e estruturas vasculares nomeadamente localizadas em áreas de estroma peritumoral de melanoma cutâneo maligno. Constataram-se diferenças estatisticamente significativas apenas na análise de expressões da endogлина em lesões CMM quando comparados pela ausência ou presença de metástases ( $p=0.015$ , tabela 1). A DMV média da endogлина em amostras de CMM foi de  $1.27 \pm 0.45$ .

### Discussão

Neste estudo, nós mostramos que as amostras de MMC de indivíduos com doença metastática apresentaram uma DMV superior. A maior imunodeteção de endoglinas amostras MMC, sugere que células de melanoma podem contribuir para o aumento da atividade proliferativa das células endoteliais no estroma peritumoral, a fim de satisfazer às suas altas demandas metabólicas, enviam sinais químicos para a criação de nichos metastáticas distantes nos órgãos alvo.

Estudos recentes têm investigado a presença de outras anomalias vasculares, que também resulta em um ganho de vascularização para MMC. Por outro lado, nossos achados adicionam mais evidências de que a DMV identificada por imunomarcagem da endogлина pode constituir um alvo potencial para a seleção de pacientes de MMC de alto risco para doença metastática, sugerindo-se estratégias terapêuticas anti-angiogênicas complementares.

### Conclusão/Conclusões

Em conclusão, a DMV parece contribuir para a ocorrência de doença metastática em pacientes com melanoma maligno cutâneo.

### Referências

- [1] Chung CY, Madhunapantula SV, Desai D, Amin S, Robertson GP. Melanoma prevention using topical PBISe. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011 Jun;4(6):935-48. PubMed PMID: 21367959. Pubmed Central PMCID: 3493621.
- [2] Segura MF, Greenwald HS, Hanniford D, Osman I, Hernando E. MicroRNA and cutaneous melanoma: from discovery to prognosis and therapy. *Carcinogenesis*. 2012 Oct;33(10):1823-32. PubMed PMID: 22693259. Pubmed Central PMCID: 3529555.
- [3] Tucker MA, Fraser MC, Goldstein AM, Struwing JP, King MA, Crawford JT, 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.
- [4] Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry Dt, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol*. 1984 Dec;15(12):1147-65. PubMed PMID: 6500548.
- [5] She X, Matsuno F, Harada N, Tsai H, Seon BK. Synergy between anti-endoglin (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.
- [6] Kumar P, Wang JM, Bernabeu C. CD 105 and angiogenesis. *J Pathol*. 1996 Apr;178(4):363-6. PubMed PMID: 8691311.
- [7] Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, et al. Endoglin (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.
- [8] Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *European journal of cancer*. 1996 Dec;32A(14):2474-84. PubMed PMID: 9059336.
- [9] Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, et al. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4018-28. PubMed PMID: 15385967. Pubmed Central PMCID: 524335.

**Tabela 1.** Análise entre a densidade de microvasos (MVD) determinada pela expressão endogлина e fatores clínico relacionados com CMM.



FÓRUM ENSINO • PESQUISA  
EXTENSÃO • GESTÃO  
**FEPEG**

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas  
e culturais • Debates • Minicursos e Palestras

REALIZAÇÃO:



APOIO:



**24 a 27**  
**setembro**

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

[www.fepeg.unimontes.br](http://www.fepeg.unimontes.br)

Variáveis	MVD	
	Expressão de endoglina	p
<u>Localização Anatômica</u>		
Baixo risco (n = 28)	1.25 (± 0.52)	0.594
Alto risco (n = 16)	1.32 (± 0.31)	
<u>Tamanho clínico</u>		
Pequeno (n = 9)	1.11 (± 0.48)	0.197
Grande (n = 35)	1.32 (± 0.44)	
<u>Ulceração no tumor primário</u>		
Ausente (n = 38)	1.27 (± 0.48)	0.775
Presente (n = 6)	1.32 (± 0.23)	
<u>Recidiva</u>		
Ausente (n = 29)	1.10 (± 0.45)	0.720
Presente (n = 15)	1.15 (± 0.34)	
<u>Metástase regional</u>		
Ausente (n = 29)	1.16 (± 0.39)	0.015*
Presente (n = 15)	1.50 (± 0.48)	
<u>Metástase distante</u>		
Ausente (n = 29)	1.16 (± 0.39)	0.015*
Presente (n = 15)	1.50 (± 0.48)	
<u>Nível de invasão deClark</u>		
I/II/III (n = 28)	1.27 (± 0.48)	0.986
IV-V (n = 16)	1.28 (± 0.41)	
<u>Espessura do tumor de Breslow</u>		
< 0.76 mm (n = 10)	1.13 (± 0.44)	0.273
> 0.76 (n = 34)	1.31 (± 0.45)	

\* Valores de rolamento asteriscos mostram associação significativa pelo teste t de Student e ANOVA. Os resultados são referentes ao percentual de células positivas exibem expressão imunohistoquímica de todas as proteínas estudadas. MVD: A densidade microvascular.