



Análise Clinicopatológica e Imunohistoquímica da Densidade Microvascular Estimada pelo PECAM-1 em Melanoma Maligno Cutâneo

Valéria Couto Quintão, Melriden Elyam Nunes, 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 é uma lesão maligna originada dos melanócitos. Essa neoplasia tem como característica apresentar as maiores taxas de mortalidade entre as neoplasias cutâneas e acometer indivíduos mais jovens, quando comparada com outras neoplasias (1-4). Das neoplasias cutâneas, o melanoma é a mais rara, porém a mais letal, representando aproximadamente 4% dos cânceres de pele; sua incidência tem aumentando em todo o mundo, sendo responsável por 2/3 de todas as mortes relacionadas com câncer de pele, constituindo assim, um relevante problema de saúde pública. [1]

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos originários do endotélio da vasculatura existente. Diversos estudos têm demonstrado que a angiogênese, isto é, a formação de novos vasos sanguíneos a partir de estruturas vasculares pré-existentes no microambiente tumoral, exerce um papel crucial na progressão neoplásica e também para a avaliação prognóstica de pacientes com câncer. [2]

A coloração imunohistoquímica de microvasos para avaliar a densidade microvascular por unidade de área é relacionado com o grau de neovascularização intratumoral, a capacidade metastática do tumor e o prognóstico em pacientes com diversos tipos de tumores sólidos. Existem vários marcadores imunológicos que podem identificar células endoteliais, incluindo os anticorpos que reconhecem epitopos do PECAM-1 e CD105. [3] A proteína CD31, ou molécula de adesão de células endoteliais de plaquetas (PECAM-1), é encontrada em grandes quantidades na superfície das células endoteliais e é menos abundante em plaquetas e leucócitos. Ela desempenha um papel importante em diversas interações celulares, particularmente em adesão entre células endoteliais e leucócitos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos, durante a inflamação, e entre células endoteliais adjacentes durante a angiogênese [4]. Muitos estudos recentes sugerem que a angiogênese apresenta um papel importante para a disseminação metastática no melanoma. Assim, dada à complexidade dos processos envolvidos na tumorigênese, deve ser considerada a possibilidade de que a expressão dos genes envolvidos na regulação da angiogênese possa contribuir para os mecanismos de metástase nos tumores cutâneos. Diante do exposto, o presente estudo procurou analisar a expressão de PECAM-1 em lesões de melanoma cutâneo e suas características clinicopatológicas.

Material e Métodos

A. Desenho do estudo.

Trata-se de um estudo transversal, retrospectivo e analítico. A amostra foi composta de 44 lesões primárias de Melanomas Malignos Cutâneos (MMC) (média de idade: $55 \pm 14,9$, proporção mulher/homem: 1:1,93, pele de cor branca: 21) confirmados microscopicamente. 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.

B. Análise clinicopatológica.

Todos MMC foram classificados de acordo com a n IUAC-TNM dos tumores malignos na base do sítio primário, conforme descrito no CID de Oncologia. Estadiamento clínico TNM I / II foi observado em nove casos (20,5%) e os estágios III / IV foi observada em 35 (79,5%) amostras de MMC. Clinicamente, MMC apresentou as formas como se segue: o melanoma disseminado superficial (n = 18, 40,9%); nodular (n = 7, 15,9%), melanoma lentigo maligno (n = 10, 22,7%), e melanoma acral lentiginoso (n = 9, 20,5%). Ulceração do tumor primário foi detectada em seis (13,6%) e recorrência foi observada em 10 (14,3%) MMC primários. Os locais anatômicos de lesões MMC foram classificados da seguinte forma: baixo risco (tronco inferior, coxa, perna, pé, membros inferiores, mãos e rosto, n = 28, 63,6%); e alto risco (costas e peito, braços, pescoço e couro cabeludo; n = 16, 38,4%).



Ausência de metástase foi notada em 15 pacientes com MMC (idade média: $56,5 \pm 15,3$; relação masculino: feminino: 12,2). Por outro lado, um grupo de 29 pacientes apresentaram CMM simultaneamente local e metástase distante no momento do diagnóstico (idade: $52,5 \pm 14,2$; relação masculino: feminino: 1: 1,5).

Secções de $5\mu\text{m}$ de tecido foram desparafinizados e corados em hematoxilina e eosina (H&E) para as análises histológicas. As análises morfológicas serão realizadas de acordo com a classificação proposta por Clark e Breslow [5,6].

C. Análise imunoistoquímica

A imunoistoquímica foi realizada a partir da confecção de cortes histológicos de $3\mu\text{m}$ seguidas das etapas de desparafinização e hidratação. As amostras foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-CD31 / PECAM-1, clone 1A10, 1: 100 e posteriormente conjugados à estreptavidina biotina peroxidase (DAKO/LSAB Kit; DAKO A/S, Denmark). Para revelação da marcação utilizou-se DAB (diaminobenzidina). O procedimento de contagem foi realizado a partir da análise de fotomicrografias utilizando um microscópio óptico (Olympus® CX31) ($0,092\text{ mm}^2$) no aumento de 400X.

D. Análise estatística e aspectos éticos

Todos os dados coletados foram digitalizados no programa de estatística SPSS®, versão 17.0, para Windows® e posteriormente submetidos a testes estatísticos específicos. Para testar a existência de associação estatística entre a expressão da proteína PECAM-1 e as análises morfológicas das lesões melanocíticas foi utilizado o teste T de Student e análise de variância (Anova). O nível de significância a ser considerado nos testes estatísticos foi fixado em 95% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Os dados clinicopatológicos e sua correlação com a expressão de PECAM-1 estão demonstrados na Tabela 1. Alta expressão da proteína PECAM-1 foi observada tanto em lesões que apresentavam metástases regionais ($p=0,036$) quanto metástase a distância ($p=0,036$) demonstrando diferença estatisticamente significativa. Não foram encontradas associações significativas com os outros fatores clinicopatológicos investigados. A angiogênese é um processo existente tanto na resposta inflamatória crônica quanto no desenvolvimento tumoral. Esse evento caracteriza-se pela formação de novos vasos a partir de um vaso pré-existente ou de células progenitoras da medula óssea. (7). Em nosso estudo observamos um aumento na expressão de PECAM-1 em lesões de melanoma maligno cutâneo que apresentam metástase regional e a distância quando comparado às lesões de melanoma maligno cutâneo não metastático. Uma maior imunodeteção de PECAM-1 em amostras de MMC sugere que as células de melanoma podem contribuir para aumentar a atividade proliferativa de células endoteliais e, assim, aumentar a rede vascular em estroma peritumoral, a fim de permitir as células do melanoma a cumprir sua alta demanda metabólica, bem como eliminar os produtos catabólicos (8). Embora a principal via para a propagação metastática de células de melanoma maligno parece ocorrer ao longo de vasos linfáticos, sabe-se que a neoangiogênese principalmente na progressão de cânceros desempenha um papel importante nos fenômenos de metástases em MMC. Em nosso estudo, as amostras MMC de indivíduos com doença metastática apresentaram uma alta DMV demonstrada pela alta expressão de PECAM-1. A associação entre a alta expressão DMV e MMC metastático também foi observado em alguns estudos (9), mas não em outros. As células de melanoma maligno liberam vários fatores de crescimento que promovem o crescimento de novos vasos sanguíneos a fim de promover a progressão do melanoma maligno cutâneo (10). A maior imunodeteção de PECAM-1 nas amostras de MMC sugere essa proteína como um importante estimulante angiogênico para favorecer a proliferação das células neoplásicas e a disseminação metastática.

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

Referências

- [1] CHEN, S. T.; A. C. Geller and H. Tsao (2013). "Update on the Epidemiology of Melanoma." *Curr Dermatol Rep* 2(1): 24-34.
- [2] FOLKMAN, J. (2006). "Angiogenesis." *Annu.Rev Med* 57: 1-18.
- [3] MULLER, P. A.; K. H. Vousden and J. C. Norman (2011). "p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion." *J.Cell Biol.* 192(2): 209-218.



- [4] RAICA, M. A. M.; Cimpean, A.M.; Ribatti, D. (2009). "Angiogenesis in pre-malignant conditions." *Eur.J.Cancer* 45(11): 1924-1934.
- [5] CLARK, W. H.; Jr., L. From, E. A. Bernardino and M. C. Mihm (1969). "The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin." *Cancer Res* 29(3): 705-727.
- [6] BRESLOW, A. (1979). "Prognostic factors in the treatment of cutaneous melanoma." *J Cutan Pathol* 6(3): 208-21.
- [7] RIBATTI, D.; Annesse, T.; Longo, V. **Angiogenesis and melanoma.** *Cancers (Basel)*. 2010;2(1):114-32. PubMed PMID: 24281035. Pubmed Central PMCID:3827594.
- [8] 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.
- [9] VALENCAK, J. *et al.* **Selective immunohistochemical staining shows significant prognostic influence of lymphatic and blood vessels in patients with malignant melanoma.** *Eur J Cancer.* 2004 Feb;40(3):358-64. PubMed PMID: 14746853.
- [10] ELIAS, E.G; Hasskamp, J.H; Sharma, B.K. **Cytokines and growth factors expressed by human cutaneous melanoma.** *Cancers (Basel)*. 2010;2(2):794-808. PubMed PMID: 24281094. Pubmed Central PMCID: 3835105.

Tabela 1. Análise entre a densidade de microvasos (DMV) determinada por PECAM-1 e fatores clínicos relacionados com MMC.

Variáveis	PECAM-1 Expressão	P
<u>Localização Anatômica</u>		
Baixo risco (n = 28)	1.62 (± 0.42)	0.586
Alto risco (n = 16)	1.56 (± 0.28)	
<u>Tamanho clínico</u>		
Pequeno (n = 9)	1.53 (± 0.32)	0.516
Grande (n = 35)	1.62 (± 0.39)	
<u>Ulceração no tumor primário</u>		
Ausente (n = 38)	1.61 (± 0.40)	0.477
Presente (n = 6)	1.50 (± 0.20)	
<u>Recorrência</u>		
Ausente (n = 29)	1.47 (± 0.42)	0.773
Presente (n = 15)	1.43 (± 0.25)	
<u>Metástases Regionais</u>		
Ausente (n = 29)	1.51 (± 0.29)	0.036*
Presente (n = 15)	1.76 (± 0.47)	
<u>Metástases à distância</u>		
Ausente (n = 29)	1.51 (± 0.29)	0.036*
Presente (n = 15)	1.76 (± 0.47)	
<u>Nível de invasão de Clark</u>		
I/II/III (n = 28)	1.62 (± 0.39)	0.687
IV-V (n = 16)	1.57 (± 0.36)	
<u>Espessura tumoral de Breslow</u>		
< 0.76 mm (n = 10)	1.56 (± 0.24)	0.751
> 0.76 mm (n = 34)	1.61 (± 0.41)	

* Valores de rolamento asteriscos mostram associação significativa pelo teste t de Student e ANOVA.
DMV: Densidade microvascular.