



**UFG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CONSTANZA THAISE XAVIER SILVA**

---

**ANÁLISE DOS FATORES EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICO-PATOLÓGICOS E  
EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS OCT4 E NANOG EM AMOSTRAS DE  
MELANOMA CUTÂNEO**

---

**Goiânia**

**2016**

## **TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**      ☐ Dissertação      ☒ Tese

### **2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Nome completo do autor: Constanza Thaise Xavier Silva

Título do trabalho: Análise dos fatores epidemiológicos, clínico-patológicos e expressão das proteínas OCT4 e NANOG em amostras de melanoma cutâneo.

### **3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM      ☐ NÃO<sup>1</sup>

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



---

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 16 / 12 / 2016

---

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

**CONSTANZA THAISE XAVIER SILVA**

---

**ANÁLISE DOS FATORES EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICO-PATOLÓGICOS E  
EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS OCT4 E NANOG EM AMOSTRAS DE  
MELANOMA CUTÂNEO**

---

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
da Saúde da Universidade Federal de  
Goiás para obtenção do Título de Doutora  
em Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Lídia Andreu Guillo  
Co-orientadora: Dra. Vera Aparecida Saddi

**Goiânia  
2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**GPT/BC/UFG**

Silva, Constanza Thaise Xavier.

Análise dos fatores epidemiológicos, clínico-patológicos e expressão das proteínas OCT4 e NANOG em amostras de melanoma cutâneo [manuscrito] / Constanza Thaise Xavier Silva. - 2016.  
127f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lidia Andreu Guillo.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,  
Faculdade de Medicina, Pós-Graduação em Ciências da Saúde,  
2016.

Bibliografia.

1. Melanoma cutâneo.
2. Célula-tronco tumoral – OCT4.
3. NANOG. I. Título.

Ata da Defesa de Tese de Doutorado realizada por **Constanza Thaise Xavier Silva**. Aos **treze dias do mês de dezembro do ano de 2016**, às 14:00 horas, reuniu-se na **PUC-Goiás** a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da defesa de Tese intitulada: **"ANÁLISE DOS FATORES EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICO-PATOLÓGICOS E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS OCT4 e NANOG EM AMOSTRAS DE MELANOMA CUTÂNEO"**, como parte de requisitos necessários à obtenção do **título de Doutora**, área de concentração **Patologia, Clínica e Tratamento das Doenças Humanas**. A Presidente da Comissão julgadora, **Profª. Drª. Lídia Andreu Guillo**, iniciando os trabalhos concedeu a palavra a candidata, para exposição em até **50 minutos** do seu trabalho. A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir a candidata durante o prazo máximo de 30 minutos, assegurando-se o mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata aprovada ou reprovada.

**Banca Examinadora**

**Aprovado(a)/Reprovado(a)**

Profª. Drª. Lídia Andreu Guillo - Presidente  
Profª. Drª. Vera Aparecida Saddi - Membro  
Profª. Drª. Lilian Carla Carneiro - Membro  
Profª. Drª. Jalsi Tacon Arruda - Membro  
Prof. Dr. Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova Costa - Membro  
Profª. Drª. Aliny Pereira de Lima - Suplente  
Profª. Drª. Sônia de Fátima Oliveira Santos - Suplente

*Aprovada*  
*APROVADA*  
*Aprovada*  
*Aprovada*  
*APROVADA*

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou a candidata **Constanza Thaise Xavier Silva** **Habilitada** ☒ **Não habilitada** ( ). Nada mais havendo a tratar, eu, **Profª. Drª. Lídia Andreu Guillo**, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

**Assinatura**

Profª. Drª. Lídia Andreu Guillo - Presidente  
Profª. Drª. Vera Aparecida Saddi - Membro  
Profª. Drª. Lilian Carla Carneiro - Membro  
Profª. Drª. Jalsi Tacon Arruda - Membro  
Prof. Dr. Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova Costa - Membro  
Profª. Drª. Aliny Pereira de Lima - Suplente  
Profª. Drª. Sônia de Fátima Oliveira Santos - Suplente

*Aprovada*  
*Vera Aparecida Saddi*  
*Carneiro*  
*Jalsi Tacon Arruda*  
*Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova Costa*

A banca examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Constanza Thaise X. Silva*  
**Constanza Thaise Xavier Silva**

*Dedico este trabalho...*

*Ao meu senhor Deus por sua preciosa e doce presença em minha vida. Aos meus queridos pais, pelo amor incondicional, incentivo e por terem me ensinado a persistir e não desistir diante das dificuldades. Ao meu esposo Lucas pelo seu amor e carinho. A minha filha Maria Eduarda pela alegria trazida. Aos meus irmãos pela amizade, apoio e confiança. Amo muito todos vocês!!!*

## AGRADECIMENTOS

---

Ao meu senhor *DEUS*, agradeço por minha vida, e por, mas esta etapa vencida. Amo-te muito meu senhor.

Aos meus pais *José Eustáquio da Silva* e *Maria Abadia Xavier Silva*, por me tornarem uma pessoa de caráter e principalmente, por me ensinar que a humildade e o conhecimento são as únicas heranças que levamos conosco. Á meu *PAI* por ser simplesmente o melhor pai do mundo. À minha *MÃE*, por todas as manhãs que me acordou para ir à aula, pelo exemplo de pessoa, esposa, amiga e mãe. Amo vocês para todo o sempre.

Ao meu esposo *Lucas Sebastião de Souza e Silva*, por estar sempre do meu lado, pela paciência, compreensão, dedicação, carinho, amizade e cumplicidade. Nada seria possível sem a sua presença e o imenso apoio em todos os momentos.

Á minha querida e amada filha *Maria Eduarda Xavier Silva*, mamãe te ama muito.

Á minha querida sogra *Maria Piedade da Silva* pelo carinho, orações e apoio de sempre.

Á minha querida orientadora *Prof.<sup>a</sup>. Dra. Lídia Andreu Guillo* pela confiança, orientação, paciência, apoio e principalmente por me ensinar a ser mais independente e criativa. Agradeço imensamente pelo aprendizado e a oportunidade.

Á minha querida *Co-orientadora Prof.<sup>a</sup>. Dra. Vera Aparecida Saddi*, um exemplo de profissional, agradeço por todas as oportunidades, pela amizade, carinho, dedicação, confiança, incentivo e paciência em todos os momentos.

Ao *Dr. Denis Masashi Sugita* pela análise das lâminas de imunohistoquímica.

A minha querida amiga: *Jalsi Tacon Arruda* pelo apoio, incentivo nos momentos tranquilos, difíceis e felizes.

Á minha família pela compreensão, orações, amor e carinho. Amo cada um e sou muito grata a Deus por ter todos vocês em minha vida.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim principalmente meus queridos alunos do curso de biologia, enfermagem e fisioterapia da UniEvangélica fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

*Muito Obrigada!!!*

## SUMÁRIO

---

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xiii
LISTA ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xiv
RESUMO .....	17
ABSTRACT .....	18
1. INTRODUÇÃO .....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	22
2.1 Pele Humana .....	22
2.2 Melanoma Cutâneo .....	28
2.3 Diagnóstico e indicadores clínico-patológicos do melanoma cutâneo....	34
2.4 Estadiamento e tratamento do melanoma cutâneo .....	46
2.5 Células-tronco tumorais .....	50
2.6 Marcadores de pluripotência - <i>POU5F1</i> /OCT4 e NANOG .....	55
3. OBJETIVOS .....	60
3.1 Objetivo Geral .....	60
3.2 Objetivos Específicos .....	60
4. MÉTODOS .....	61
4.1 Aspectos éticos .....	61
4.2 Tipo de estudo e casuística .....	61
4.3 Seleção das amostras .....	61
4.4 Estudo imunohistoquímico .....	62
4.5 Análise do perfil imunoistoquímico .....	63
4.6 Análises estatísticas .....	67
5. RESULTADOS .....	69
6. DISCUSSÃO .....	85
7. CONCLUSÕES .....	96
8. REFERÊNCIAS .....	98
9. ANEXOS .....	117
9. 1 Anexo A: Parecer consubstanciado do CEP/UFG .....	117



9.2 Anexo B: Parecer consubstanciado do CEP/ACCG .....	121
10. APÊNDICE .....	125
10.1 Apêndice A - Aspectos clínicos patológicos do melanoma .....	125
10.2 Apêndice B: Ficha de avaliação imunohistoquímica .....	126

## LISTA DE FIGURAS

---

	Página
<b>Figura 1.</b> Desenho esquemático evidenciando as estruturas: epiderme, derme e hipoderme, e as células constituintes .....	22
<b>Figura 2.</b> Desenho esquemático do melanócito (em marrom). Seus prolongamentos citoplasmáticos se insinuam entre as células da epiderme. Os grânulos de melanina são transferidos para o citoplasma dos queratinócitos.....	24
<b>Figura 3.</b> Desenho esquemático das camadas da epiderme (A). Imagem ao microscópio óptico dos estratos da epiderme (B) .....	26
<b>Figura 4.</b> Regra do ABCDE. No melanoma as lesões podem apresentar: Assimétricas, Bordas irregulares, Cores múltiplas, Diâmetro maior que 6 mm e Evolução da lesão.....	35
<b>Figura 5.</b> Melanoma Extensivo Superficial. Características oriundas de melanoma cutâneo, tais como, assimetria, bordas irregulares, coloração variada e diâmetro maior que 6 milímetros são observadas nesta lesão melanocítica .....	36
<b>Figura 6.</b> Características oriundas do melanoma nodular, tais como, surgimento de um nódulo, coloração enegrecida ou marrom-avermelhada são observadas nesta lesão melanocítica .....	37
<b>Figura 7.</b> Características oriundas do melanoma acral lentiginoso plantar como pigmentações marrom-enegrecidas são observadas nesta lesão melanocítica .....	38

<b>Figura 8.</b> Características oriundas do lentigo maligno melanoma como coloração variada com múltiplos tons de castanho-claro a negro, suas bordas são irregulares e denteadas como observados nesta lesão melanocítica. Acomete mais áreas fotoexpostas como a face e o pescoço...	40
<b>Figura 9.</b> Desenho esquemático das camadas da pele de acordo com a espessura do tumor em milímetros segundo o índice de Breslow .....	41
<b>Figura 10.</b> Desenho esquemático do nível de invasão de Clark referente à localização do tumor em relação às diversas camadas da pele .....	42
<b>Figura 11.</b> Desenho esquemático evidenciando uma célula-tronco normal com habilidade de autorrenovação e capacidade proliferativa extensa que sofreu mutações originando as células-tronco tumorais .....	51
<b>Figura 12.</b> Desenho esquemático evidenciando a função do OCT4 como regulador da pluripotência das células-tronco. A expressão do OCT4 permite que as células permaneçam no estágio indiferenciado e quando o mesmo é inativado resulta em diferenciação das células-tronco e por consequência, gera a perda de pluripotência.....	56
<b>Figura 13.</b> Fotomicrografia de células neoplásicas de melanoma cutâneo exibindo positividade difusa e intensa para núcleo e difusa fraca para citoplasma (OCT4 – imunohistoquímica, 400X) .....	64
<b>Figura 14.</b> Fotomicrografia de células neoplásicas de melanoma cutâneo exibindo positividade difusa e intensa para citoplasma e difusa fraca para núcleo (NANOG imunohistoquímica, 400X) .....	64

<b>Figura 15.</b> Fotomicrografia de células tumorais germinativas de seminoma positivas (marcação nuclear difusa, imunohistoquímica, 400X). A) OCT4, B) NANOG .....	65
<b>Figura 16.</b> Fotomicrografia de células tumorais de hepatocarcinoma exibindo negatividade de núcleo e citoplasma para OCT4 (imunohistoquímica, 400X) .....	66
<b>Figura 17.</b> Fotomicrografia de colón sem malignidade exibindo negatividade de núcleo e citoplasma para NANOG (imunohistoquímica, 400X) .....	66
<b>Figura 18.</b> Fotomicrografia de células neoplásicas de melanoma cutâneo não evidenciando imunorreatividade na omissão do anticorpo primário. A) OCT4, B) NANOG .....	67
<b>Figura 19.</b> Distribuição dos principais sítios de metástases à distância entre os pacientes com melanoma cutâneo .....	72
<b>Figura 20.</b> Curvas de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida global em cinco anos (60 meses) dos pacientes com melanoma cutâneo .....	73
<b>Figura 21.</b> Curvas de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida em cinco anos (60 meses) comparando o índice de Breslow para os pacientes com melanoma cutâneo .....	73
<b>Figura 22.</b> Curvas de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida em cinco anos (60 meses) comparando o nível de Clark para os pacientes com melanoma cutâneo .....	74

<b>Figura 23.</b> Curvas de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida global em cinco anos (60 meses) comparando com desenvolvimento de metástases para os pacientes com melanoma cutâneo .....	75
<b>Figura 24.</b> Curva ROC comparando com o índice de Breslow para OCT4 nuclear.....	76
<b>Figura 25.</b> Curvas de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida em cinco anos (60 meses) comparando com a expressão de OCT4 (núcleo) para os pacientes com melanoma cutâneo .....	78
<b>Figura 26.</b> Curva ROC comparando com o índice de Breslow para OCT4 citoplasmática .....	79
<b>Figura 27.</b> Curvas de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida em cinco anos (60 meses) comparando com a expressão de OCT4 (citoplasma) para os pacientes com melanoma cutâneo .....	81
<b>Figura 28.</b> Curva ROC comparando com o índice de Breslow para NANOG citoplasmática .....	82
<b>Figura 29.</b> Curvas de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida em cinco anos (60 meses) comparando com a expressão de NANOG (citoplasma) para os pacientes com melanoma cutâneo .....	84

## LISTA DE TABELAS

---

	Página
<b>Tabela 1:</b> Classificação TNM para o melanoma cutâneo.....	46
<b>Tabela 2:</b> Estadiamento clínico do melanoma cutâneo.....	47
<b>Tabela 3:</b> Estadiamento patológico do melanoma cutâneo.....	48
<b>Tabela 4:</b> Distribuição dos casos analisados de acordo com o gênero e idade no diagnóstico do melanoma dos pacientes no estudo.....	69
<b>Tabela 5:</b> Distribuição das variáveis clínicas e histopatológicas dos pacientes portadores de melanoma cutâneo no estudo.....	71
<b>Tabela 6:</b> Análise de regressão logística das possíveis associações entre a hipoexpressão ( $\leq 20\%$ ) e hiperexpressão ( $> 21\%$ ) de OCT4 (núcleo) e os aspectos patológicos em pacientes com melanoma cutâneo .....	77
<b>Tabela 7:</b> Análise de regressão logística das possíveis associações entre a hipoexpressão ( $\leq 30\%$ ) e hiperexpressão ( $> 31\%$ ) de OCT4 (citoplasma) e os aspectos patológicos em pacientes com melanoma cutâneo .....	80
<b>Tabela 8:</b> Análise de regressão logística das possíveis associações entre a hipoexpressão ( $\leq 37\%$ ) e hiperexpressão ( $> 38\%$ ) de NANOG (citoplasma) e os aspectos patológicos em pacientes com melanoma cutâneo .....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

### ABREVIATÕES

ABCD	Assimetria, Bordas irregulares, Cor heterogênea e Diâmetro maior do que 6mm
ABCDE	Assimetria, Bordas irregulares, Cor heterogênea e Diâmetro maior do que 6mm e Evolução
ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
AJCC	Do inglês, American Joint Committee on Cancer
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CBC	Carcinomas basocelulares
CDK4	Do inglês, Cyclin-dependent kinase 4
CDKN2A	Do inglês, Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CEC	Carcinomas espinocelulares
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos
CID	Classificação Internacional de doenças
CPI	Coeficiente padronizado de incidência
CSCs	Do inglês, Cancer Stem Cells
DAB	Diamino-benzidina
DNA	Do inglês, Deoxyribonucleic Acid
DP	Desvio padrão
EFG	Elevação, Firmeza à palpação e Crescimento (do inglês, growth)
FDA	Do inglês, Food and Drug Administration
HAI	Hospital Araújo Jorge
IC	Intervalo de confiança de 95%
IE	Intensidade da expressão
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iPSC	Do inglês, Induced Pluripotent Stem Cells
LDH	Desidrogenase láctica
LM	Lentigo maligno
LMM	Lentigo maligno melanoma

MC1R	Do inglês, Melanocortin 1 receptor
MES	Melanoma extensivo superficial
MAL	Melanoma acral lentiginoso
MN	Melanoma nodular
NANOG	Tir Nan Nog, chamada em inglês de Land of Eternal Youth "Terra da Eterna Juventude"
OCT4	Do inglês, octamer-binding transcription factor 4
OMIM	Do inglês, Online Mendelian Inheritance in Man
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds ratio
PBS	Tampão fosfato salino
PCP	Percentual de Células Positivas
PIT	Pontuação da Imunomarcacão Total
RGP	Do inglês, Radial Growth Phase
ROC	Do inglês, Receiver Operating Characteristic
SAP	Setor de Anatomia Patológica
SIM	Sistema de Informação sobre Mortalidade
TNM	T - tumor primário, N – comprometimento de linfonodo regional e M - metástases a distância
UFG	Universidade Federal de Goiás
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
VGP	Do inglês, Vertical Growth Phase
$\alpha$ -MSH	Hormônio estimulante de melanócito alfa

## SÍMBOLOS

%	Porcentagem
=	Igual
≤	Menor e igual
≥	Maior e igual



$\chi^2$	Teste do Qui quadrado
cm	Centímetro
mm <sup>2</sup>	Milímetro quadrado
mm	Milímetro

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos, afetando predominantemente adultos jovens e de meia-idade. Diversas evidências sugerem a existência células-tronco tumorais para o melanoma. Os genes *POU5F1/OCT4*, *NANOG* vem sendo estudados como marcadores células-tronco tumorais. O *OCT4* e o *NANOG* estão envolvidos na manutenção da pluripotência e autorrenovação das células-tronco embrionárias indiferenciadas. Este estudo tem por objetivo avaliar os fatores epidemiológicos, clínico-patológicos e expressão da proteína *OCT4* e *NANOG* em amostras de melanoma cutâneo. Foram selecionados 102 casos para o estudo epidemiológico, clínico e patológico, diagnosticados entre os anos de 2004 a 2008. Para estudo de sobrevida foram selecionadas pacientes com seguimento de até 60 meses, com óbito registrado. Dos 102 casos avaliados foram observados 62,7% do gênero feminino e 37,3% masculino; com média de idade de 57,2 anos e 63,1 respectivamente ( $p= 0,0026$ ). A idade de maior prevalência ao diagnóstico do melanoma foi entre 51 a 70 anos (44,1%  $p= 0,023$ ). Nesse estudo, houve predomínio das lesões localizadas no tronco (32,3%). Ao exame histopatológico quanto ao tipo de crescimento do tumor, houve predomínio do tipo extensivo superficial em 52,9% dos casos. Segundo o índice de Breslow predominaram as lesões com  $\leq 1,0\text{mm}$  em 39,2% dos indivíduos, seguidas pelas lesões  $>4,0\text{mm}$  em 23,5% dos casos. De acordo com o nível de Clark 29,4% dos casos foram classificados no nível IV; seguidas por 25,5% casos com nível V; Clark II em 23,5%; Clark III em 20,6%; e Clark I em apenas 1 caso (1,0%). Houve metástases em 47% dos casos e os principais sítios de localização foram: linfonodos, cérebro, pele e pulmão. Em relação à evolução clínica dos pacientes ocorreram 26 casos de óbitos por melanoma (25,5%). A curva de sobrevida calculada no seguimento de 60 meses foi de 73,0%. A análise univariada revelou associações significativas entre a hiperexpressão nuclear de *OCT4* e as seguintes variáveis: índice de Breslow com espessura de  $> 2,1\text{ mm}$  ( $p= 0,021$ ; OR: 2,64; IC 95%: 1,15 - 6,05); níveis de Clark, IV e V ( $p= 0,001$ ; OR: 4,11; IC 95%: 1,79 - 9,46); ulceração presente ( $p\leq 0,0001$ ; OR: 459,0; IC 95%: 51,67 - 4077,27); presença de metástases ( $p\leq 0,0001$ ; OR: 40,25; IC 95%: 12,90 - 125,62) e óbito por melanoma cutâneo ( $p\leq 0,0001$ ). As associações significativas entre a hiperexpressão citoplasmática de *OCT4* e as seguintes variáveis foram: ulceração presente ( $p= 0,015$ ; OR: 2,73; IC 95%: 1,21 - 6,16); presença de metástases ( $p= 0,004$ ; OR: 3,34; IC 95%: 1,47 - 7,62) e óbito por melanoma cutâneo ( $p= 0,039$ ; OR: 2,67; IC 95%: 1,05 - 6,77). E as associações significativas entre a hiperexpressão citoplasmática de *NANOG* e as seguintes variáveis foram: ulceração presente ( $p\leq 0,0001$ ); presença de metástases ( $p\leq 0,0001$ ) e óbito por melanoma cutâneo ( $p= 0,030$ ). Nosso estudo demonstraram uma forte associação dos genes *OCT4* e *NANOG* como os piores fatores prognósticos do melanoma cutâneo.

**Palavras-chave:** melanoma, células-tronco tumorais, imunoistoquímica, *NANOG* e *OCT4*.

Cutaneous melanoma is a type of skin cancer that originates in melanocytes, predominantly affecting young and middle-aged adults. Several evidence suggests that cancer stem cells exist for melanoma. The POU5F1 / OCT4, NANOG genes have been studied as cancer stem markers. OCT4 and NANOG are involved in the maintenance of pluripotency and self-renewal of undifferentiated embryonic stem cells. This study aims to evaluate the epidemiological, clinical-pathological and expression of the OCT4 and NANOG proteins in cutaneous melanoma samples. We selected 102 cases for the epidemiological, clinical and pathological study, diagnosed between the years 2004 to 2008. For survival study, patients with a follow-up of up to 60 months were selected, with a recorded death. Of the 102 cases evaluated, 62.7% were female and 37.3% male; With mean age of 57.2 years and 63.1 years respectively ( $p = 0.0026$ ). The most prevalent age at diagnosis of melanoma was between 51 and 70 years (44.1%  $p = 0.023$ ). In this study, there was a predominance of lesions located in the trunk (32.3%). Histopathological examination of the type of tumor growth showed a predominance of the superficial extensive type in 52.9% of the cases. According to the Breslow index, lesions with  $\leq 1.0$  mm predominated in 39.2% of the individuals, followed by lesions  $> 4.0$  mm in 23.5% of the cases. According to the Clark level 29.4% of the cases were classified in level IV; Followed by 25.5% cases with level V; Clark II in 23.5%; Clark III in 20.6%; And Clark I in only 1 case (1.0%). There were metastases in 47% of the cases and the main localization sites were: lymph nodes, brain, skin and lung. Regarding the clinical evolution of the patients, there were 26 cases of deaths due to melanoma (25.5%). The survival curve calculated at the 60-month follow-up was 73.0%. Univariate analysis revealed significant associations between nuclear overexpression of OCT4 and the following variables: Breslow index with thickness  $> 2.1$  mm ( $p = 0.021$ , OR: 2.64, 95% CI: 1.15-6.05 ); Levels of Clark, IV and V ( $p = 0.001$ , OR: 4.11, 95% CI: 1.79-9.46); ulceration present ( $p \leq 0.0001$ ; OR: 459.0; 95% CI: 51.67-4077.27); Presence of metastases ( $p < 0.0001$ , OR: 40.25, 95% CI: 12.90-125.62), and death from cutaneous melanoma ( $p < 0.0001$ ). The significant associations between cytoplasmic hyperexpression of OCT4 and the following variables were: present ulceration ( $p = 0.015$ , OR: 2.73, 95% CI: 1.21-6.16); Presence of metastases ( $p = 0.004$ , OR: 3.34, 95% CI: 1.47 - 7.62) and death from cutaneous melanoma ( $p = 0.039$ , OR 2.67, 95% CI 1.05 - 6,77). And the significant associations between the cytoplasmic hyperexpression of NANOG and the following variables were: present ulceration ( $p \leq 0.0001$ ); Presence of metastases ( $p \leq 0.0001$ ) and death due to cutaneous melanoma ( $p = 0.030$ ). Our study demonstrated a strong association of the OCT4 and NANOG genes as the worst prognostic factors of cutaneous melanoma.

**Keywords:** melanoma, cancer stem cells immunohistochemistry, NANOG and OCT4.

O câncer de pele é a neoplasia de maior incidência em todo mundo. Pode ser dividido em não melanoma (carcinoma basocelular ou carcinoma epidermóide) e melanoma. O câncer de pele do tipo não melanoma é o mais incidente no país, sendo responsável por aproximadamente 1/5 dos casos novos de câncer. Porém, por apresentar altos índices de cura, sua taxa de mortalidade é uma das mais baixas. A maior incidência deste tipo de câncer de pele se dá na região da cabeça e do pescoço que são justamente os locais de exposição direta aos raios ultravioleta (INCA, 2016a).

Por outro lado, o melanoma, responsável por aproximadamente 4% dos casos de câncer de pele, apresenta uma alta letalidade, principalmente pela sua alta capacidade de desenvolvimento de metástases sendo responsável por 60% de todas as mortes por neoplasias cutâneas (GIBLIN; THOMAS, 2007; KUPHAL; BOSSENHOFF, 2009). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimam-se, aproximadamente 5.670 casos novos/ano sendo 3.000 homens e 2.670 mulheres no ano de 2016 com melanoma cutâneo no Brasil, com 1.547 casos de óbito, sendo 903 homens e 644 mulheres (INCA, 2016b).

De acordo com os registros de câncer de base populacional no país, a cidade de Goiânia encontra-se com a maior porcentagem de casos calculados pelo coeficiente padronizado de incidência (CPI) para o melanoma cutâneo invasivo, entre os homens (8,1/100.000), seguido por São Paulo (7,8/100.000) e Porto Alegre (7,4/100.000). Entre as mulheres, os maiores CPI, para o melanoma cutâneo invasivo, são encontrados em Poços de Caldas (6,9/100.000), Goiânia (6,1/100.000) e Porto Alegre (5,9/100.000) (INCA, 2013).

O melanoma cutâneo é uma neoplasia maligna que se desenvolve a partir dos melanócitos, células produtoras de melanina que determina a cor da pele que são derivadas da crista neural, que residem na camada basal da epiderme (CHUDNOVSKY; KHAVARI; ADAMS, 2005). Raramente o melanoma cutâneo acontece sem contexto. Este contexto pode ser histórico (melanoma familiar, queimadura solar na infância) ou físico (nevus atípicos e número aumentados de nevus) (GANDINI et al., 2005).

A doença acontece com frequência discretamente maior no sexo feminino, que também apresenta melhor prognóstico e é incomum em crianças (MACKIE et al., 2002). É, portanto, uma doença da fase adulta, afetando predominantemente adultos de meia-idade (YAO; BALCH; WINCHESTER, 2009). Em indivíduos brancos as localizações preferenciais do melanoma são membros inferiores e dorso, para mulheres e homens, enquanto que, em não brancos, as localizações preferenciais são região plantar, palmar, leito ungueais e mucosas (TSAO; SOBER, 2005).

Na maioria dos casos, o melanoma desenvolve-se como uma proliferação intraepidérmica de melanócitos neoplásicos que pode ser manter isolados na epiderme ou na derme superficial. Neste estágio de desenvolvimento, o melanoma é quase sempre curável com uma excisão cirúrgica adequada. As características biológicas essenciais da fase de crescimento radial do melanoma aparecem vagarosamente, mas com intensa proliferação de células atípicas na epiderme, que podem ou não ser acompanhadas por uma migração neoplásica para as papilas dérmicas (MICHALANY, 2014).

Em um estágio mais avançado, a lesão pode formar nódulos expansivos e infiltrar na derme reticular chegando à hipoderme. Nesta fase, denominada fase de crescimento vertical, a lesão adquire a capacidade de metastatizar e seu prognóstico é diretamente relativo à profundidade de invasão que foi proposto por Alexander Breslow, à medida em milímetros de espessura do tumor desde a camada granulosa, eliminando o critério subjetivo da análise (BRESLOW, 1970). O índice de Breslow ainda é o mais importante fator prognóstico do melanoma (BALCH et al., 2009).

O diagnóstico precoce certamente é o principal objetivo no que diz respeito à prevenção secundária. O melanoma pode ter bom prognóstico se não for espesso, com taxas de cura que se aproximam de 100% nos melanomas *in situ*. Quando o diagnóstico feito a partir do índice de Breslow, ultrapassar 4mm, a sobrevida em 5 anos cai para menos de 50% (BALCH et al., 2001). Pois, ao contrário da maioria dos outros tumores em que um tumor de 2mm a 3mm é considerado muito inicial, no melanoma esse tumor já é considerado localmente avançado, com grande letalidade, sendo o tratamento cirúrgico após o diagnóstico precoce a única chance de cura (BELFORT; ALMEIDA, 2014).

De acordo com o modelo e progressão, da hiperplasia do melanócitos ao melanoma, poderia ser dividida em cinco etapas histologicamente distintas: nevos comuns; nevos atípicos; melanoma de crescimento radial; melanoma de crescimento vertical e melanoma metastático (GRAY-SCHOPFER et al., 2006). Entretanto, sabe-se que grande parte dos melanomas cutâneos não se originam de nevos melanocíticos e sim, *de novo*. Isto sugere que a grande parte dos melanomas não segue este modelo de progressão (ZABIEROWSKI; HERLYN, 2008).

Diversas evidências sugerem a existência de células-tronco tumorais para o melanoma. Células primitivas autorrenováveis seriam capazes de iniciar a tumorigênese e originar células altamente proliferativas e mais diferenciadas que constituem o centro da massa tumoral (SCHATTON et al., 2008; ZABIEROWSKI; HERLYN, 2008).

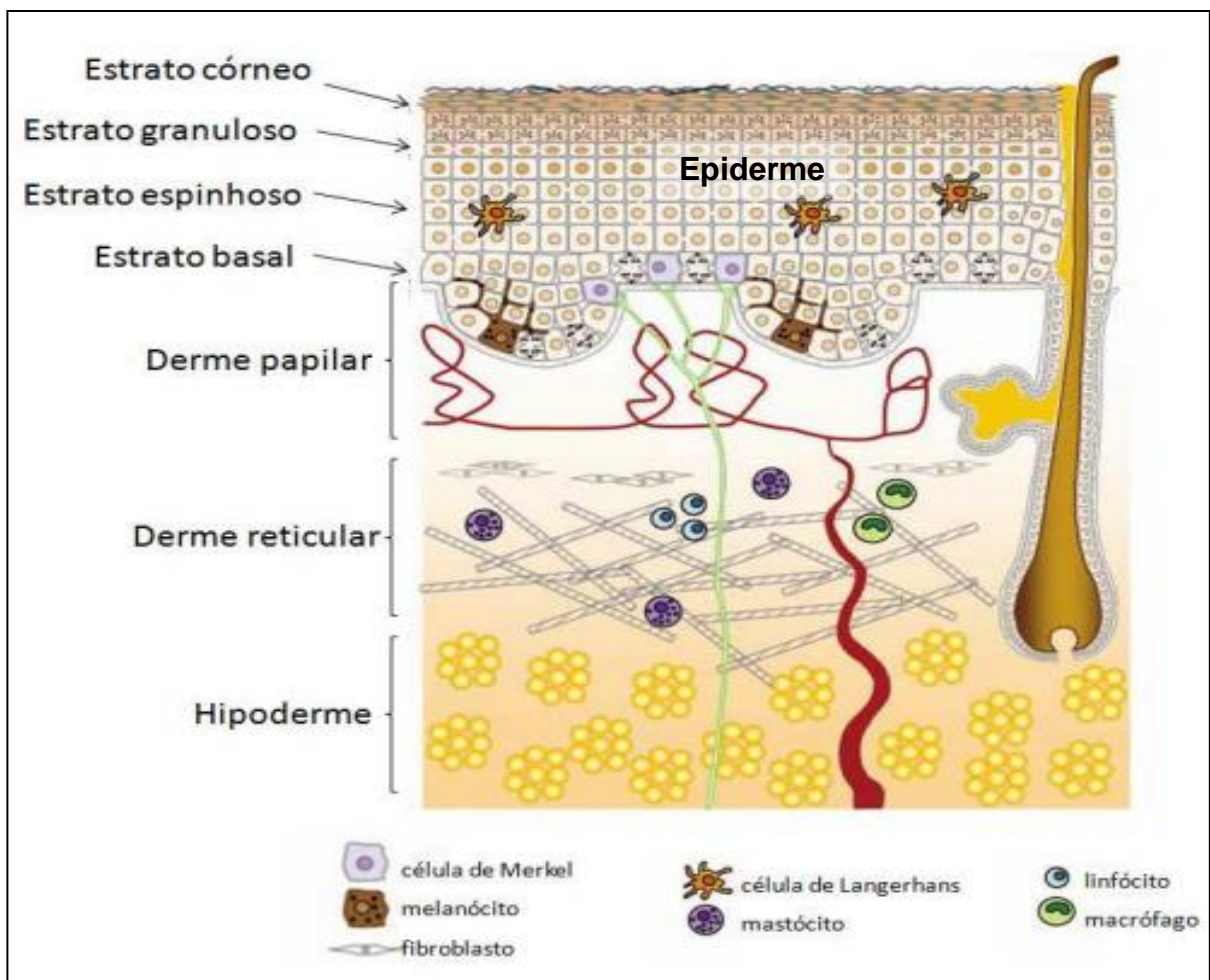
Alguns trabalhos sugerem genes marcadores de pluripotência associados às células-tronco incluindo os genes POU5F1/OCT4 e NANOG, que podem ter um papel crítico na regulação de células-tronco tumorais de alguns tumores como: pulmão, pâncreas, mama, fígado e esses genes mostraram-se associados com mau prognóstico e maior risco de metástase (CHIOU et al., 2010; LU et al., 2013; WANG et al., 2014; YIN et al., 2015).

Já no melanoma, evidenciou-se, que a hiperexpressão do gene OCT4 e NANOG, aumenta a capacidade destas células de transmigração, através do ganho da motilidade amebóide, levando a uma maior capacidade de invasão e agressividade (BORRULL et al., 2012).

Desta forma, considerando a importância das células-tronco tumorais na progressão de tumores e a escassez de estudos que utilizam estes marcadores para identificação destas células em melanoma, o objetivo deste estudo foi identificar as por meio da imunoistoquímica, a expressão das proteínas OCT4 e NANOG em melanoma, visando identificar a possível presença de células-tronco tumorais e fornecer subsídios que auxiliem na compreensão e no prognóstico desta neoplasia.

### 2.1 Pele Humana

A pele recobre toda a superfície externa do corpo humano, é o maior órgão, tanto em área de superfície quanto em peso. Estruturalmente, a pele consiste em duas partes: a epiderme, mais fina e superficial e a derme, mais profunda e mais espessa. A epiderme (*epi* = em cima; *dermis* = pele) é avascular composta de tecido epitelial. A derme é vascularizada e composta por tecido conjuntivo. Logo abaixo da derme e não fazendo parte da pele, está a camada subcutânea (*sub*- = por baixo de; *cutis* = pele) ou hipoderme (*hipo*- = debaixo de), composta por tecido adiposo e areolar. As camadas da pele (epiderme + derme) e a tela subcutânea formam o tegumento comum, como ilustrado na figura 1 (LUCO, 2014).



**Figura 1.** Desenho esquemático evidenciando as estruturas: epiderme, derme e hipoderme e as células constituintes. **Fonte:** Adaptado de CAMPOS, 2010.

A epiderme é constituída por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, não possui rede capilar e deriva do ectoderma (CAMPOS, 2010). É constituída por quatro a cinco camadas, podendo variar de acordo com a exposição a atritos. Na maior parte, a epiderme possui quatro camadas, porém, em pontos de maior exposição ao atrito há cinco camadas (HARRIS, 2009).

A epiderme possui quatro tipos principais de células: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Cerca de 90% das células epidérmicas são queratinócitos (*keratino* = feito de chifre; *cito* = célula), dispostos em quatro ou cinco camadas, produzindo a queratina e grânulos lamelares. Aproximadamente 8% das células da epiderme são melanócitos, que se desenvolvem a partir da crista neural do embrião em desenvolvimento e que produzem o pigmento melanina. Essas células são nutridas por difusão dos nutrientes a partir dos vasos sanguíneos da derme (CAMPOS, 2010; TORTORA; NIELSEN, 2013).

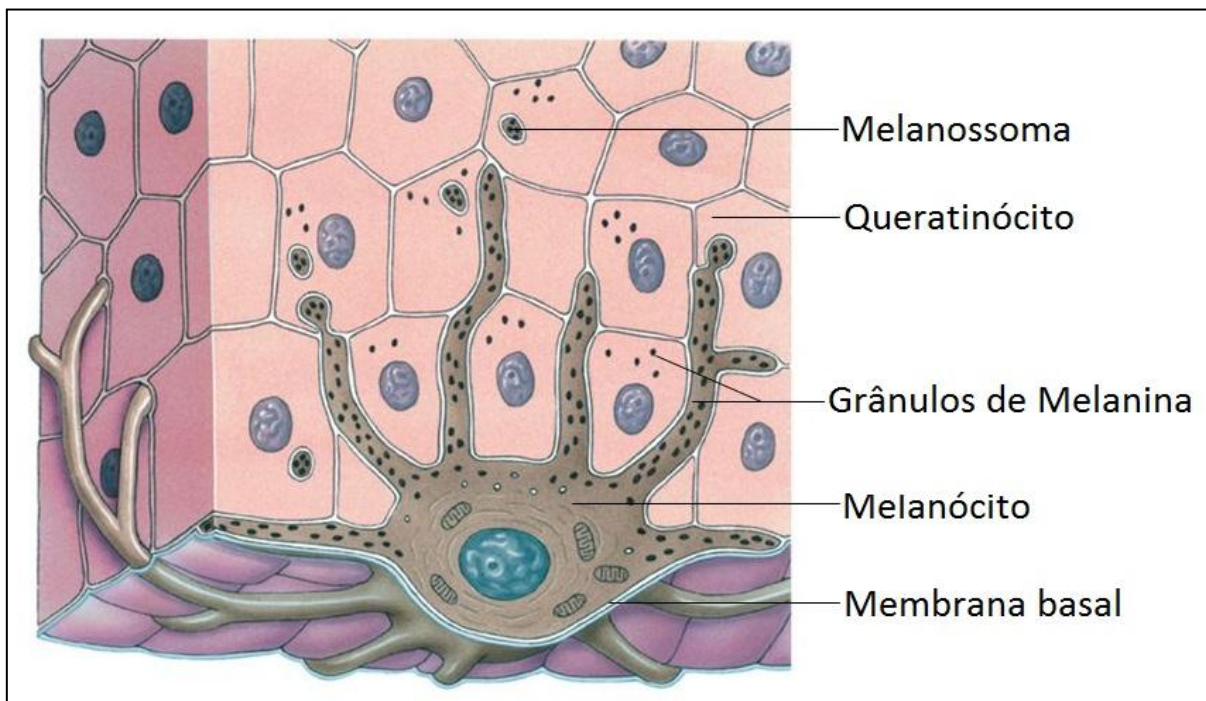
Durante o desenvolvimento embriológico os melanócitos, derivam da população germinativa de melanoblastos, originários de células da crista neural, logo após o fechamento do tubo neural (GOLDSMITH, 1991; MARTINI; NATH; BARTHOLOMEW, 2010). Possuem corpo celular cúbico com prolongamentos ramificados em formato dendrítico, estendendo-se por entre vários queratinócitos, facilitando a transferência de grânulos de melanina (DUVIVIER, 1997; TORTORA; NIELSEN, 2013).

A melanina (*melas* = negro), sintetizada a partir da tirosina, é um pigmento que atua na coloração da pele e absorve os raios ultravioletas (UV) (KHAN et al., 2012). A tirosinase atua sobre a tirosina, produzindo um complexo enzimático cúprico-proteico, sintetizado no retículo endoplasmático rugoso e transferido para o complexo de golgi, sendo aglomerado em unidades envoltas por membrana, ou seja, os melanossomas (CAMPOS, 2010; LUCO, 2014).

Os melanossomas são transferidos de seu local de síntese, a região perinuclear dos melanócitos, até as pontas de seus dendritos. Posteriormente, são transferidos aos queratinócitos, os quais podem fagocitar algumas porções de dendritos carregados de melanina ou melanossomas livres no espaço intracelular (Figura 2). Os grânulos de melanina no queratinócito formam uma proteção em volta do núcleo, no lado exposto para a superfície da pele. Assim, protegem o ácido desoxirribonucléico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*, *DNA*) nuclear dos raios UV.



Contudo, os melanócitos são especialmente suscetíveis à lesão por raios UV (MIOT et al., 2009; KHAN et al., 2012).



**Figura 2.** Desenho esquemático do melanócito (em marrom). Seus prolongamentos citoplasmáticos se insinuam entre as células da epiderme. Os grânulos de melanina são transferidos para o citoplasma dos queratinócitos. **Fonte:** Adaptado de MARTINI; NATH; BARTHOLOMEW, 2010.

Dois subtipos de melanina são produzidos: a eumelanina, um pigmento marrom-preto e a feomelanina, um pigmento vermelho-amarelado, ou uma mistura de ambos, que determina a coloração da pele e do cabelo. O número de melanócitos num indivíduo, independente da etnia, é sempre similar ao de qualquer outro, porém a coloração da pele é determinada pelo tamanho, quantidade e distribuição dos grânulos de melanina, que são fatores geneticamente determinados (YAAR; GILCHREST, 2001; KHAN et al., 2012).

Várias camadas distintas de queratinócitos, em diferentes estágios de desenvolvimento, formam a epiderme. Na maioria do corpo a epiderme possui quatro estratos ou camadas: córneo delgado, granular, espinhoso e o basal, e é chamada de pele fina. Nos locais onde a exposição ao atrito é maior (nas pontas dos dedos, palmas e solas) a epiderme possui cinco camadas: córneo espesso, lúcido, granular, espinhoso e o basal, sendo chamada de pele grossa (TORTORA; NIELSEN, 2013).

O estrato córneo é a camada mais superficial da epiderme, constituído por 25 a 30 camadas, em média, de queratinócitos (ou corneócitos), sem núcleo nem organelas, mortos e achatados, repletos de queratina. São os produtos finais do processo de diferenciação dos queratinócitos. Esse estrato pode variar de espessura de algumas células na pele fina a 50 ou mais camadas celulares na pele espessa (HARRIS, 2009).

Este estrato mais externo da epiderme é frequentemente mencionado como camada cornificada, na qual as células são continuamente substituídas por outras provenientes dos estratos mais profundos (CAMPOS, 2010). Essas múltiplas camadas protegem as demais camadas contra lesão e invasão microbiana. Contudo, a exposição constante da pele ao atrito, estimula a produção de queratina, resultando na formação de um calo ou um espessamento anormal do estrato córneo (TORTORA; NIELSEN, 2013).

O estrato lúcido (*lucidus* = claro, nítido) é a segunda camada da epiderme, presente somente na pele espessa: como nas pontas dos dedos, palmas e solas. Constituído de quatro a seis camadas de queratinócitos mortos, achatados e claros, com grande quantidade de queratina e membrana plasmática espessa, fornecendo uma resistência adicional a essas regiões (HARRIS, 2009; CAMPOS, 2010).

O estrato granular está situado aproximadamente no meio da epiderme. Consiste em três a cinco camadas de queratinócitos com núcleo central, citoplasma carregado de grânulos de queratina, achatados e que estão passando pelo processo de apoptose (STARK, 1999; LUCO, 2014). Essas células começam a se degenerar à medida que se afastam da fonte de nutrição que são os vasos sanguíneos da derme, marcando a transição entre os estratos metabolicamente ativos mais profundos e as células mortas dos estratos mais superficiais (HARRIS, 2009).

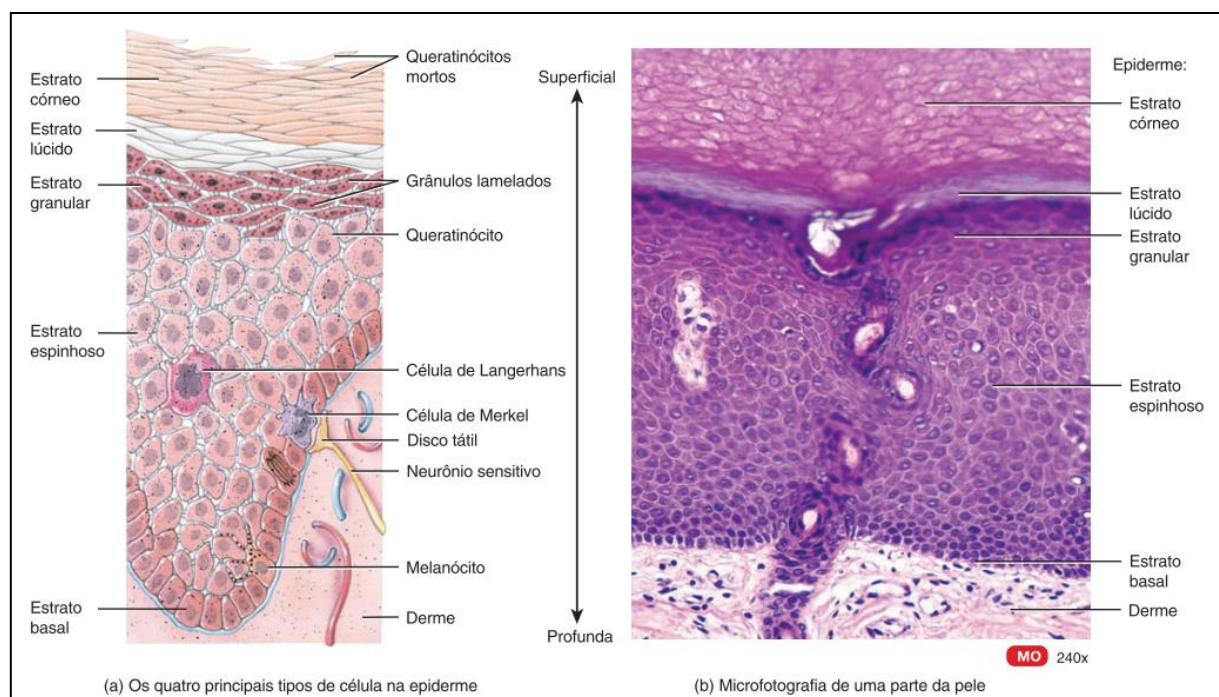
Há nesse estrato, a presença de grânulos da proteína querato-hialina, de coloração escura, que participa na montagem dos filamentos intermediários da queratina. Os grânulos lamelares se fundem com a membrana plasmática e liberam uma secreção rica em lipídio impermeável, que preenche os espaços entre as células do estrato granular, estrato lúcido e estrato córneo (HARRIS, 2009; CAMPOS, 2010).

O estrato espinhoso é a camada mais espessa da epiderme, constituído de queratinócitos (ou células de Malpighi) dispostos em 8 a 10 camadas. São

produzidos pelas células-tronco presentes na camada basal, com as mesmas organelas e alguns matam a capacidade de divisão celular (CAMPOS, 2010).

Esses queratinócitos produzem feixes mais espessos de filamentos intermediários de queratina que estão inseridos nos desmossomos mantendo as células firmemente unidas umas às outras, proporcionando resistência e flexibilidade à pele (TORTORA; NIELSEN, 2013). Há ainda células de Merkel (ou células epiteliais táteis) com função sensorial, células de Langerhans (macrófagos intraepidérmicos) que atuam na defesa a agentes estranhos e projeções dos melanócitos que passam pelas camadas da epiderme (HARRIS, 2009; LUCO, 2014).

O estrato basal (ou germinativo) é a camada mais profunda da epiderme (Figura 3). Composta por uma única fileira de queratinócitos colunares ou cúbicos, alguns dos quais se dividem continuamente produzindo novos queratinócitos (CAMPOS, 2010). Essas células apresentam núcleos grandes, citoplasma contendo muitos ribossomos, um pequeno complexo de Golgi, algumas mitocôndrias e um pouco de retículo endoplasmático rugoso. O citoesqueleto possui filamentos intermediários de queratina que formam a queratina das camadas mais superficiais da epiderme e protege as camadas mais profundas de lesões. Contém ainda células de Merkel (com discos táteis associados) e melanócitos (LUCO, 2014).



**Figura 3.** Desenho esquemático das camadas da epiderme (A). Imagem ao microscópio óptico dos estratos da epiderme (B). **Fonte:** TORTORA; NIELSEN, 2013.

Situada logo abaixo da epiderme, a derme é composta por tecido conjuntivo denso não modelado. Origina-se do mesoderma, da placa do mesoderma lateral e do dermatômo dos somitos. As principais funções da derme são: atuar como tecido de sustentação para a epiderme, manter a homeostase, promover flexibilidade e fornecer proteção contra traumas mecânicos (SUPP; BOYCE, 2005). Contém fibras elásticas e colágenas que proporcionam resistência à tração, também possui a capacidade de se distender e encolher facilmente. É mais espessa do que a epiderme, variando de acordo com a região corporal (HARRIS, 2009; LUCO, 2014).

Apresentam como células constituintes: os fibroblastos, células endoteliais, células de músculo liso e as células migratórias que incluem: macrófagos, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e células dendríticas intersticiais dérmicas (células de imunovigilância), assim como uma grande porção de matriz extracelular. Há também vasos sanguíneos, nervos, glândulas e folículos pilosos na derme (SUPP; BOYCE, 2005; TORTORA; NIELSEN, 2013).

Os fibroblastos são as células mais frequentes na derme, responsáveis por elaborar a rede de fibras e pela síntese de macromoléculas que compõe esta matriz extracelular. Também possuem atividade intensa durante o processo de cicatrização. Ao redor das células e fibras existem mucopolissacarídeos, glicosaminoglicanas e água (HAASS; HERLYN, 2005).

A derme é essencial para a nutrição da epiderme, mantendo relações funcionais e estruturais importantes. É dividida por um limite indistinto em uma região papilar superficial fina constituída por tecido conjuntivo frouxo e uma região reticular mais profunda e espessa, constituída por tecido conjuntivo denso (HARRIS, 2009; CAMPOS, 2010).

Na região papilar há pequenas estruturas digitiformes que se projetam na superfície inferior da epiderme, formando as papilas dérmicas, além de fibras elásticas e colágenas. Algumas papilas contêm terminações nervosas sensitivas, os corpúsculos de Meissner (receptores táteis). Outras possuem terminações nervosas livres sensitivas de calor, frio, dor, cócegas e prurido (TORTORA; NIELSEN, 2013; LUCO, 2014).

A região reticular está fixada à tela subcutânea e possui feixes de fibras colágenas espessas (em forma de malha), algumas fibras elásticas espessas, fibroblastos dispersos e macrófagos. Vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríferas ocupam os espaços entre as

fibras. Em algumas partes corporais as fibras colágenas na região reticular da derme orientam-se mais em uma determinada direção devido a tensão natural resultante de projeções ósseas, orientações dos músculos e movimentos articulares (CAMPOS, 2010).

Ambas as camadas da derme, apresentam densas redes de pequenos vasos sanguíneos, que se originam dos vasos musculares subjacentes e enviam ramos para a tela subcutânea. Essas redes alimentam as extensas alças capilares das papilas dérmicas (SUPP; BOYCE, 2005).

Já a tela subcutânea ou hipoderme está abaixo da derme, não faz parte da pele e difere conforme a região corporal (TORTORA; NIELSEN, 2013). Em algumas áreas apresenta-se como uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo, ou tecido areolar. Em outras regiões é uma camada espessa resistente com faixas fibrosas de colágeno, acompanhada por células adiposas que se agrupam formando lóbulos. Essa camada tem a função de proteger o organismo contra choques e traumatismos, atuando ainda como reserva energética e isolante térmico (WILLIAMS; KUPPER, 1996; SPELLBERG, 2000; CHUONG et al., 2002).

As fibras que se estendem a partir da derme ancoram a pele à tela subcutânea, que, por sua vez, se fixa à fáscia subjacente e ao tecido conjuntivo que circunda os ossos e músculos. A tela subcutânea contém vasos sanguíneos calibrosos que irrigam e drenam os capilares da pele e também os corpúsculos de Pacini sensíveis à pressão (TORTORA; NIELSEN, 2013).

## **2.2 Melanoma Cutâneo**

O câncer de pele é a neoplasia de maior incidência em todo mundo. Pode ser dividido em não melanomas e melanomas. O tipo não melanoma inclui os carcinomas basocelulares (CBC) que correspondem entre 70% a 80% dos casos e os carcinomas espinocelulares (CEC) que representam 20% a 30%. Afeta os queratinócitos, possuem menor morbidade, representando 95% dos casos de câncer de pele e geralmente cursam de forma satisfatória (DONG et al., 2010). Já o tipo melanoma que se origina nos melanócitos, apresenta baixa incidência, cerca de 4% dos tumores de pele. Este é considerado o tumor cutâneo de maior importância, pois quando diagnosticado de forma tardia pode chegar a 80% de todas as mortes causadas por câncer de pele (GRUPO BRASILEIRO DE MELANOMA, 2016).

A palavra melanoma provém do grego *melas* - significa escuro, negro e o sufixo *oma*, tumor. O melanoma pode ocorrer em diversos tecidos como: o trato urinário, o globo ocular, o sistema auditivo, o tubo digestivo, o sistema nervoso central, entre outros, porém, o melanoma cutâneo é o mais frequente, sendo responsável pela grande maioria dos casos de tumores primários diagnosticados (SCHATTON; FRANK, 2008).

A incidência global do melanoma cutâneo é de 132.000 casos por ano. (WHO, 2016). No Brasil a estimativa do Instituto Nacional de Câncer (INCA) em 2016 para as taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de melanoma, apresentando a maior incidência desse tipo de câncer na região Sul, com uma taxa de 6,96 homens e 6,50 mulheres diagnosticados. Ainda, segundo essa estimativa a região Sudeste com uma taxa de 2,83 homens e 2,53 mulheres; no Centro-Oeste 2,84 homens e 2,09 mulheres; no Nordeste 2,02 homens e 1,36 mulheres e na região Norte 0,84 homens e 0,65 mulheres (INCA, 2016a).

Segundo INCA, estimam-se, aproximadamente 5.670 casos novos/ano sendo 3.000 homens e 2.670 mulheres com melanoma cutâneo no Brasil, com 1.547 casos de óbito, sendo 903 homens e 644 mulheres (INCA, 2016b). O melanoma é predominante em indivíduos caucasianos, com idade média do diagnóstico na faixa etária de 45 a 55 anos (MACKIE et al., 2002).

O melanoma cutâneo (CID 10 - C43) é definido como uma neoplasia maligna derivada dos melanócitos. Essas células exercem a resposta da pele frente à exposição à luz ultravioleta, que sintetiza e transfere os grânulos de melanina empacotados em melanossomos para os queratinócitos, que interagem com os melanócitos na chamada unidade de pigmentação cutânea. A proporção entre o número de melanócitos e queratinócitos basais e suprabasais é de 1:35 na pele, aproximadamente (SLOMINSKI; ROSS; MIHM, 1995; HICKS; FLAITZ, 2000). Por meio dos dendríticos dos melanócitos são transferidos os melanossomos (rico em melanina) para o citoplasma dos queratinócitos, que uma vez incorporados são capazes de proteger as células epiteliais (HICKS; FLAITZ, 2000; CHUDNOVSKY; KHAVARI; ADAMS, 2005).

A quantidade de melanócitos presentes na epiderme varia segundo a região anatômica, sendo cabeça e antebraço as regiões com maior densidade dessas células. Estímulos externos tais como a radiação UV pode induzir à proliferação dos

melanócitos. Em indivíduos expostos à radiação solar, observa-se um aumento da quantidade em regiões do corpo mais expostas (CASTANET; ORTONNE, 1997).

Os melanócitos neoplásicos no melanoma apresentam-se por uma proliferação descontrolada, atipia morfológica e perda da inibição por contato (característica importante dos melanócitos normais), distribuindo-se em ninhos, grupos ou lençóis celulares. Essas células também apresentam acentuado pleomorfismo, podendo exibir núcleos grandes, irregulares, hipercromáticos e por vezes múltiplos nucléolos proeminentes e atividade mitótica intensa (HICKS; FLAITS, 2000).

De acordo com a homeostase da pele, os melanócitos podem permanecer quiescentes, proliferar ou ativar o processo de apoptose (BISSELL; RADISKY, 2001). Distúrbios nesse equilíbrio podem desencadear a tumorigênese levando à formação do melanoma. A cadeia de eventos que leva a instalação do câncer inclui a proliferação descontrolada com transtornos na diferenciação celular, a invasão e a metástase para órgãos distantes, além de eventos relacionados a alterações na comunicação e adesão entre as células neoplásicas e vizinhas (PARK; BISSELL; BARCELLOS-HOFF, 2000; BATAILLE, 2003).

Conforme a localização anatômica e o padrão de crescimento do melanoma, foi proposto um modelo de progressão. De acordo com esse modelo a progressão da hiperplasia do melanócito ao melanoma, poderia ser dividida em cinco etapas histologicamente distintas: a) nevos comuns (pinta ou sinal) que representa lesões melanocíticas iniciais originadas a partir da proliferação de melanócitos; b) nevos atípicos, que se caracteriza por um crescimento aberrante dos melanócitos e apresentam características de assimetria, bordas irregulares, coloração diferencial e diâmetro superior aos nevos comuns; c) melanoma de crescimento radial (do inglês, *radial growth phase, RGP*), ou horizontal, apresentam células neoplásicas presente na epiderme e derme, mas apenas com ativa proliferação na epiderme; d) melanoma de crescimento vertical (do inglês, *vertical growth phase, VGP*) ocorre intensa capacidade proliferativa das células neoplásicas na derme; e) melanoma metastático quando as células neoplásicas migram através do estroma, penetrando em vasos sanguíneos e linfáticos se estabelecendo em outros órgãos (GRAY-SCHOPFER et al., 2006).

Entretanto, sabe-se que grande parte dos melanomas cutâneos não se origina de nevos melanocíticos, e sim, *de novo*. Isto sugeriria que a grande parte dos

melanomas poderia não seguir este modelo de progressão (ZABIEROWSKI; HERLYN, 2008).

Diversas evidências sugerem a existência de células-tronco tumorais (do inglês, *câncer stem cells* – CSCs) para o melanoma. Células primitivas autorrenováveis seriam capazes de iniciar a tumorigênese e originar células altamente proliferativas e mais diferenciadas que constituem o centro da massa tumoral (SCHATTON et al., 2008; ZABIEROWSKI; HERLYN, 2008).

A hipótese de que o câncer pode ser gerado a partir de células com propriedades de células-tronco (totipotência) veio da sugestão de que os tecidos tumorais continham populações celulares com características reminiscentes das de células embrionárias, as quais permaneciam dormentes, mas poderiam ser ativadas e originar células cancerígenas (SCHATTON et al., 2008). Além da capacidade de autorrenovação e da diferenciação, essas células-tronco tumorais apresentam diversas propriedades presentes também em células-tronco normais, como expressão ativa de telomerasas, aumento da atividade de transportes de xenobióticos, como medicamentos, habilidades de migração e capacidade de crescimento autônomo (ZABIEROWSKI; HERLYN, 2008).

O conhecimento sobre as células-tronco tumorais no desenvolvimento do câncer tem ganhado muita importância nos últimos anos na área da oncologia. Visto que o reconhecimento de algumas de suas características justificaria muitos casos de falha terapêutica e ainda, devido a sua capacidade de autorrenovação, são apontadas como as responsáveis pelo processo de repopulação tumoral após a utilização da quimioterapia e radioterapia (HUANG et al., 2007).

Entretanto, é importante ressaltar que faltam evidências que comprovem se essas células-tronco tumorais no melanoma seriam originárias de células-tronco situadas na derme, diretamente de melanoblastos ou se seriam provenientes de melanócitos diferenciados que sofreram importante processo de diferenciação (KUPHAL; BOSSERHOFF, 2009).

Os fatores de risco para o melanoma geralmente são divididos em: ambientais e genéticos. Dentre os fatores de risco ambientais destaca-se a radiação UV presente na luz solar sendo o maior agente etiológico associado ao desenvolvimento do melanoma (PARK et al., 2009). A radiação UV pode ser dividida de acordo com o comprimento de onda, sendo UVA (320-400nm), UVB (280-320nm) e UVC (100-280nm), sendo essa última barrada pela camada de ozônio. Já a UVA e



UVB chegam à superfície da Terra em uma proporção de 90% e 10%, respectivamente. Apesar da radiação UVA ser mais abundante, UVB é cerca de 1.000 vezes mais eficiente em causar queimaduras de pele (NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010).

Estudos em modelos experimentais de nevos irradiados por UVB demonstram que doses desta radiação, compatíveis com aquelas que ocorrem em queimaduras solares, levam a uma série de alterações morfológicas transitórias semelhantes a nevos atípicos e até o melanoma *in situ* (MARIANTE, 2003; BAKOS et al., 2007).

Dentre os fatores de risco genético no desenvolvimento do melanoma, destacam-se mutações genéticas (genes de alta penetrância) ou variações polimórficas (genes de baixa penetrância). Os genes de alta penetrância são tidos como os responsáveis pelo histórico familiar de desenvolvimento do melanoma (HAYWARD, 2003).

A maior parte dos melanomas surge de forma esporádica, porém, tumores de origem familiar representam não mais do que 10% dos casos. Dentre os genes de alta penetrância o gene *CDKN2A* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), localizado no braço curto do cromossomo 9, corresponde a maioria dos casos de melanoma familiar (25-40% dos casos). Esse gene codifica duas proteínas importantes na regulação do ciclo celular, principalmente frente a lesões no DNA (MACKIE; HAUSCHILD; EGGERMONT, 2009).

Outro gene que demonstrou ter relação com o melanoma familiar foi o gene *CDK4* (*cyclin-dependent kinase 4*), que codifica uma proteína responsável pela progressão do ciclo celular. Apesar de demonstrar ser um fator hereditário no desenvolvimento da doença, apenas três famílias foram descritas como portadores de mutações em *CDK4* (MEYLE; GULDBERG, 2009).

Já os genes de baixa penetrância, apresentam um risco aumentado de melanoma, porém, inferior aquele conferido por mutações nos genes *CDKN2A/CDK4*. Também encontrado em associação com variantes de outros genes, principalmente associados às vias de sinalização da pigmentação (BISHOP et al., 2009).

O gene *MC1R* (*melanocortin 1 receptor*) é um dos genes mais importantes na determinação da pigmentação da pele e pelos. Está localizado no braço longo do cromossomo 16 e codifica um receptor acoplado à proteína G com afinidade pelo hormônio estimulante de melanócito alfa ( $\alpha$ -MSH). A ligação de  $\alpha$ -MSH com *MC1R*

funcional na superfície dos melanócitos estimula a ação da tirosinase e a produção de eumelanina que determina o pigmento escuro. Esse gene é bastante polimórfico, sendo que mais de 80 variantes já foram descritas e determinam as diferentes cores da pele e cabelos (RAIMONDI et al., 2008).

Alterações alélicas no *MC1R* estão associadas aos fenótipos de suscetibilidade, particularmente com o fenótipo “ruivo”. Outras mudanças do mesmo gene demonstraram estar associadas com o desenvolvimento de melanoma independente do fenótipo ruivo pontuando, portanto, a participação do *MC1R* independente da via de pigmentação da pele (PASTORINO et al., 2008). Segundo Williams et al. (2011), analisaram nove polimorfismos desse gene (V60L, D84E, V92M, R142H, R151C, I155T, R160W, R163Q e D294H) e indicou que todas as variantes conferem risco aumentado de melanoma.

Os polimorfismos de genes responsáveis pelo reparo do DNA de lesões causadas por UV também foram implicados em risco para melanoma. O xeroderma pigmentoso é uma doença autossômica recessiva, caracterizada por mutações nos genes responsáveis por diferentes etapas da via de reparo ao DNA por excisão de nucleotídeo. Em indivíduos com menos de 20 anos, há um aumento de 10.000 vezes na incidência de câncer de pele não melanoma e de 2.000 vezes na incidência de melanoma (PASZKOWSKA-SZCZUR et al., 2013).

Outros fatores de risco importantes estão relacionados ao fenótipo onde se destacam indivíduos de pele com fototipos mais claros (tipos de pele I e II segundo Fitzpatrick - 1975) e principalmente de olhos e cabelos claros, presença de efélides e múltiplos nevos melanocíticos, atípicos ou displásicos e a história familiar de melanoma (MILLER; MIHM, 2006; DIMATOS et al., 2009).

Do ponto de vista de saúde pública são duas as formas de intervenção que potencialmente podem limitar o impacto do melanoma na sociedade. Uma consiste na aplicação de medidas que visam limitar a exposição dos indivíduos aos fatores de risco, a prevenção primária e a outra na utilização de medidas que visam realizar o diagnóstico de lesões iniciais, quando o tratamento potencialmente fornece melhores resultados, fazendo parte da prevenção secundária (GANDINI et al., 2005).

Para a prevenção primária os resultados são obtidos ao longo do tempo, quando efetivamente aplicados, pois incluem medidas educacionais em relação à exposição solar e cuidados de fotoproteção. Exigem mudanças de comportamento e

nos hábitos, atuação política com a implementação e cumprimento de legislação específica (ENOKIHARA; GOMES, 2014).

Na prevenção secundária faz-se necessário à realização de programas educativos para a população, fundamental para o diagnóstico precoce do melanoma. Essa situação é bastante evidente nos casos de melanoma acral-lentiginoso que, no Brasil, acomete predominantemente as regiões do Nordeste e Sudeste, afetando, na maioria das vezes, indivíduos negros e mulatos que migraram da região Nordeste para São Paulo (MAIA et al., 2003).

O autor supracitado alerta ainda para a falta dessa informação, pois em grande parte das campanhas o alvo é o melanoma em pessoas brancas, negligenciando as outras etnias, ou mesmo, a grande miscigenação que ocorre no Brasil. As campanhas de elucidação à população, autoexame da pele, exame físico cuidadoso de toda a pele, exames auxiliares (dermatoscopia, mapeamento corporal, fotografia e fotodermatoscopia) e a confirmação do diagnóstico pelo exame histopatológico podem produzir resultados no diagnóstico precoce do melanoma (ENOKIHARA; GOMES, 2015).

### **2.3 Diagnóstico e indicadores clínico-patológicos do melanoma cutâneo**

A avaliação clínica inicia-se com a suspeita da lesão melanocítica. Entre os principais critérios de diagnóstico clínico do melanoma encontra-se a regra mnemônica do ABCD (**A**ssimetria, **B**ordas irregulares, **C**or heterogênea e **D**iâmetro maior do que 6mm), criado em 1985 atua como um alerta para médicos e leigos. Ainda que a presença simultânea desses quatro parâmetros não seja necessária para o diagnóstico, a identificação de uma ou mais dessas características desperta a atenção para a possibilidade da neoplasia demandando uma avaliação especializada (KRATHEN, 2012).

Embora a eficiência da regra do ABCD tenha sido comprovada nas últimas duas décadas, existem exceções e limitações. Os principais exemplos dessas situações clínicas em que a regra do ABCD não é válida são: o melanoma nodular, o melanoma amelanótico, o melanoma inicial e o melanoma nevoide em que as condições das lesões podem apresentar simetria, bordas regulares, cor homogênea e diâmetro inferior de 6mm. Além do mais, a regra do ABCD pode estar presente em outras lesões pigmentadas que não o melanoma como ceratoses seborreicas,

carcinomas basocelular e nevos melanocíticos atípicos, entre outros (ABBASI et al., 2008).

Diante dessas limitações, foi inicialmente recomendado o acréscimo da letra **E** (Elevação) ao ABCD. A proposta não teve uma boa aceitação, já que essa alteração ocorre geralmente em uma fase mais avançada do melanoma, onde já tem desenvolvimento de metástases. Atualmente, a Letra E refere-se à conotação **Evolução** (*Evolving*) englobando vários tipos de modificações, não apenas relativas ao tamanho, mas também à forma, à simetria, à superfície (erosão, ulceração, elevação), à periferia da lesão (halo) e à presença de sinais e sintomas (prurido, sangramento, dor, exsudação e escamação) (KRATHEN, 2012; BITTENCOURT, 2014).

O comportamento dinâmico dessa neoplasia maligna vem sendo enfatizado com o acréscimo da letra E, determinando o ABCDE (Figura 4). Essa adição fortalece o ABCDE como método de diagnóstico clínico do melanoma, aprimorando sua acurácia diagnóstica (BITTENCOURT, 2014).



**Figura 4.** Regra do ABCDE. No melanoma as lesões podem apresentar: **Assimétricas**, **Bordas irregulares**, **Cores múltiplas**, **Diâmetro maior que 6 mm** e **Evolução** da lesão. **Fonte:** Adaptado de CLÍNICA PRIETO LUNA, 2010.

O exame histopatológico é importante na confirmação do diagnóstico clínico, além de auxiliar na terapêutica. O melanoma é classificado histologicamente em quatro principais tipos: melanoma extensivo superficial (MES), melanoma nodular (MN), melanoma acral lentiginoso (MAL) e lentigo maligno melanoma (LMM) (BERWICK; WIGGINS, 2006).

O melanoma extensivo superficial (MES) também chamado, expansivo superficial ou disseminativo superficial (Figura 5) é o subtipo mais frequente em indivíduos da raça branca e apenas 2% têm pele parda ou negra, sendo responsável por aproximadamente 70% dos casos, sendo o subtipo mais encontrado (ALMEIDA; ALMEIDA, 2009). Geralmente provém de um nevo melanocítico preexistente no local e acomete principalmente indivíduos entre 30 e 50 anos, preferencialmente no tronco dos homens e membros inferiores das mulheres, o que sugere que esta forma clínica esteja associada à exposição solar sazonal (BERWICK; WIGGINS, 2006).

O MES é caracterizado por uma fase radial de crescimento constituída por grandes melanócitos anaplásicos que se insinuam entre os queratinócitos da epiderme com padrão pagetoide. Depois de ocuparem grande parte da epiderme, os melanócitos anaplásicos invadem a derme papilar focalmente e posteriormente, toda a derme reticular e até mesmo a hipoderme. Esse tipo de comprometimento da epiderme é denominado de disseminação pagetoide devido à sua semelhança com a doença de Paget (MICHALANY, 2014).



**Figura 5.** Melanoma Extensivo Superficial. Características oriundas de melanoma cutâneo, tais como, assimetria, bordas irregulares, coloração variada e diâmetro maior que 6 milímetros são observadas nesta lesão melanocítica. **Fonte:** PELLE DIGITALE DERMATOLOGIA, 2011.



O MES é a lesão para a qual a regra do ABCDE melhor se aplica. Clinicamente o MES apresenta-se como uma mácula ou placa hiperocrômica, assimétrica, com borda irregular, em geral com uma ou mais endentações e padrão de cor variado. Raramente, a lesão pode ser verrucosa, tendo difícil distinção com a ceratose seborreica (FORMAN et al., 2008). O MES geralmente ocorre sobre um nevo preexistente, apresenta duas fases de crescimento: o crescimento radiado que costuma durar de 1 a 5 anos e que a lesão aumenta em superfície, podendo surgir nódulos elevados, sangramento ou transudação. Após este período, apresenta uma fase de invasão da derme (crescimento vertical) com maior poder de invasão (SKENDER-KALNENAS; ENGLISH; HEENAN, 1995).

O melanoma nodular (MN) é o segundo mais comum, 15% a 30% dos casos, ocorrem mais frequentemente em indivíduos com idade entre 50 e 60 anos, mais em homens do que em mulheres. O MN é caracterizado pelo surgimento de um nódulo em pele clinicamente normal, sem fase prévia de crescimento radiado, ou que esta tenha sido muito transitória, a ponto de não ter sido percebida (GELLER et al., 2009). Apresenta-se como lesão elevada, bem delimitada, formando um nódulo séssil ou pediculado, por vezes multilobular, de coloração marrom-avermelhada ou enegrecida, eventualmente com áreas cinza-azuladas (Figura 6).



**Figura 6.** Características oriundas do melanoma nodular, tais como, surgimento de um nódulo, coloração enegrecida ou marrom-avermelhada são observadas nesta lesão melanocítica. **Fonte:** PCDS, 2016.

São frequentes a ulceração e o sangramento; existe a variante amelanótica, com superfície crítematosa. De qualquer modo, ocorre invasão dérmica precoce. Desta forma, caracteriza-se por apresentar evolução mais rápida que os outros subtipos. O tronco costuma ser a área de predileção deste subtipo. Menos

frequentemente pode haver histórico de nevo melanocítico preexistente no local, característica que justifica seu maior potencial para produzir metástases (BETTI et al., 2008). Ocorre no MN um crescimento vertical de melanócitos atípicos que preenchem a derme papilar ou ninhos de células sobre outros ninhos, exibindo mitoses. Pode apresentar-se clinicamente como pápula ou nódulo de coloração uniforme negra, acinzentado ou amelanótico (GELLER et al., 2009).

É importante ressaltar que a regra dos critérios clínicos do ABCDE, mais adaptada a outros subtipos de melanoma, nem sempre é útil para o diagnóstico da forma nodular, pois muitas vezes o nódulo é bastante simétrico, com bordas regulares, cores uniformes e de pequenos diâmetros. Por essa razão, tem sido usada a regra “EFG” para a identificação para identificação do MN os achados clínicos mais frequentes dessas lesões: elevação, firmeza à palpação e crescimento (do inglês, *growth*) contínuo por um mês (KALKHORAN et al., 2010). O melanoma nodular está associado a um pior prognóstico comparado ao extensivo superficial por apresentar maior tendência ao crescimento vertical (BETTI et al., 2008).

Outro subtipo é o melanoma acral lentiginoso (MAL), ocorre frequentemente nas regiões glabras das mãos (palmas), pés (plantas) e subungueal e representam aproximadamente 2% a 8% de todos os melanomas. Os MAL mostram-se como pigmentações marrom-enegrecidas nas regiões palmoplantares (Figura 7) podendo ser observados aspectos nodular e ulceração. A regra ABCDE não deve ser aplicada como diretriz para o diagnóstico de malignidade nas lesões acrais, uma vez que, mesmo as benignas, revelariam características atípicas segundo esses critérios como assimetria, bordas irregulares e mais de uma cor (JÚNIOR MEIRA; ABBADE; STOLF, 2015).



**Figura 7.** Características oriundas do melanoma acral lentiginoso plantar como pigmentações marrom-enegrecidas são observadas nesta lesão melanocítica. **Fonte:** PELLE DIGITALE DERMATOLOGIA, 2011.

O MAL é o menos frequente na população não caucasiana; isto é, os hispânicos de 20%-34%, asiáticos 35%-49% e afrodescendentes 50%-70% dos casos de melanoma em geral. É o mais frequente na faixa etária de 60-70 anos, com ligeira predominância no sexo feminino (STALKUP; ORENGO; KATTA, 2002).

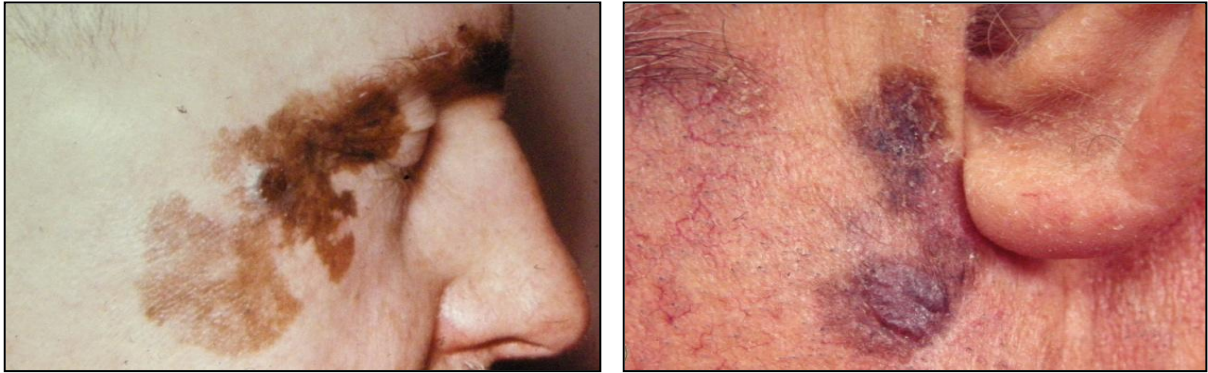
O melanoma subungueal frequentemente é confundido com hematomas subungueais ou infecções fúngicas do aparelho ungueal. Deve-se prestar especial atenção a lesões pigmentadas no leito ungueal ou faixas assimétricas e com várias cores ou que estão se modificando nessas regiões. A lesão subungueal mais comumente ocorre no 1º quirodáctilo ou pododáctilo. O prognóstico desse subtipo de melanoma geralmente não é bom, devido ao atraso no diagnóstico (LEVIT et al., 2000).

O lentigo maligno (LM) é um tipo de melanoma *in situ*, que tipicamente acomete áreas fotoexpostas como a face e o pescoço, em indivíduos idosos e pode apresentar progressão lenta e ocasional para doença invasiva, sendo designado lentigo maligno melanoma (LMM) (SMALBERGER; SIEGEL; KHACHEMOUNE, 2008). O LMM representa de 4% a 15% de todos os melanomas com incidência entre 65 a 80 anos, com prognóstico relativamente favorável. Seu crescimento é lento e insidioso, podendo permanecer em fase radial de crescimento por 10 a 15 anos (DUNCAN, 2009).

Esse subtipo apresenta classicamente como uma mácula pigmentada de superfície lisa, não descamativa e tamanho muito variável, podendo ter de 0,5 até 20cm de diâmetro. Comumente tem coloração variada com múltiplos tons de castanho-claro a negro, ocasionalmente também cinza, azulado, rosa, vermelho ou branco; suas bordas são irregulares e denteadas, por vezes entremeadas por pele aparentemente sã (Figura 8). A presença de áreas azuladas, pápulas ou nódulos sugere doença provavelmente invasiva (SMALBERGER; SIEGEL; KHACHEMOUNE, 2008).

Além da classificação histológica do melanoma mais comum (melanoma extensivo superficial, nodular, acral lentiginoso e lentigo maligno), algumas formas menos usuais de melanoma podem ser encontradas na pele. Dentre os subtipos de melanoma cutâneo destacamos: melanoma desmoplásico, melanoma decorrente do nevo azul, melanoma decorrente do nevo gigante congênito, melanoma da infância, melanoma nevoide e melanoma persistente (MICHALANY, 2014).





**Figura 8.** Características oriundas do lentigo maligno melanoma como coloração variada com múltiplos tons de castanho-claro a negro, suas bordas são irregulares e denteadas como observados nesta lesão melanocítica. Acomete mais áreas fotoexpostas como a face e o pescoço. **Fonte:** OAKLEY, 2016.

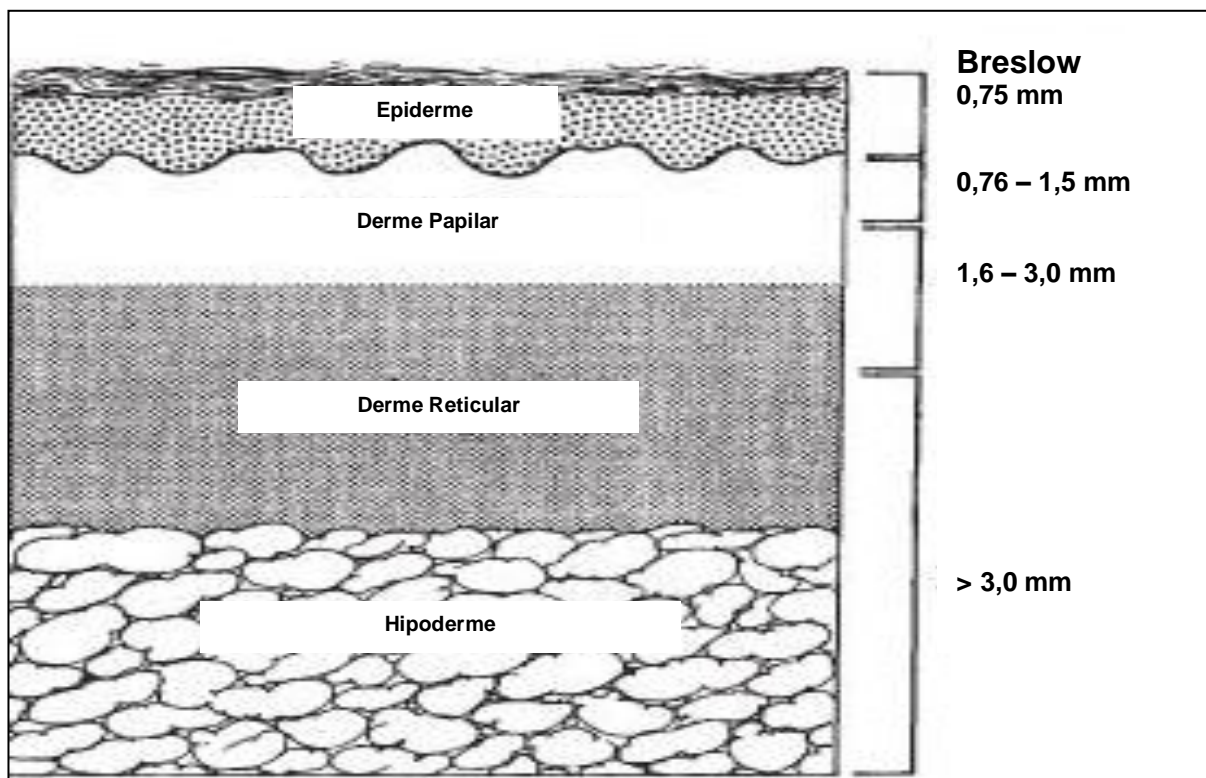
De acordo com a *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) para melanoma, determinou novas diretrizes para avaliação das características histológicas essenciais e opcionais para a lesão primária do melanoma. Dentre as características essenciais pode-se destacar: espessura tumoral em mm (Breslow); nível de invasão anatômico (nível de Clark); índice mitótico dérmico, mitoses/mm<sup>2</sup>; ulceração; microsatelitose; fase de crescimento vertical e margens de ressecções cirúrgicas laterais e profundas (livres ou comprometidas). Já as características opcionais são: invasão angiolinfática, subtipo histológico, neurotropismo, regressão, classificação do estágio T e infiltrado linfocitário intratumoral e peritumoral (BICHAKJIAN; HALPERN; JOHNSON, 2011).

Contudo, o laudo histológico completo deverá conter tanto os dados essenciais como os opcionais. A sequência deve iniciar com o subtipo histológico que, apesar de ser um item opcional, torna o laudo mais prático, uma vez que o diagnóstico é o primeiro item a ser avaliado, aprimorando desta forma a avaliação do prognóstico de pacientes com melanoma (MICHALANY, 2014).

O índice de Breslow foi desenvolvido por Alexander Breslow em 1970 e é o mais importante fator prognóstico de sobrevida, trata-se da medida em milímetros de espessura do tumor desde a parte superior do estrato granuloso da epiderme até sua porção mais profunda (Figura 9). Nos casos de melanoma ulcerados, a medida é feita a partir da base da úlcera até a célula presente mais profundamente na invasão. O índice de Breslow apresenta maior reprodutibilidade e melhor correlação com o prognóstico quando comparado com os níveis de Clark (BALCH et al., 2009).

Os níveis de Clark têm sido utilizados com valor prognóstico em pelo menos um grupo de casos, pois é essencial para o estadiamento apenas para tumores

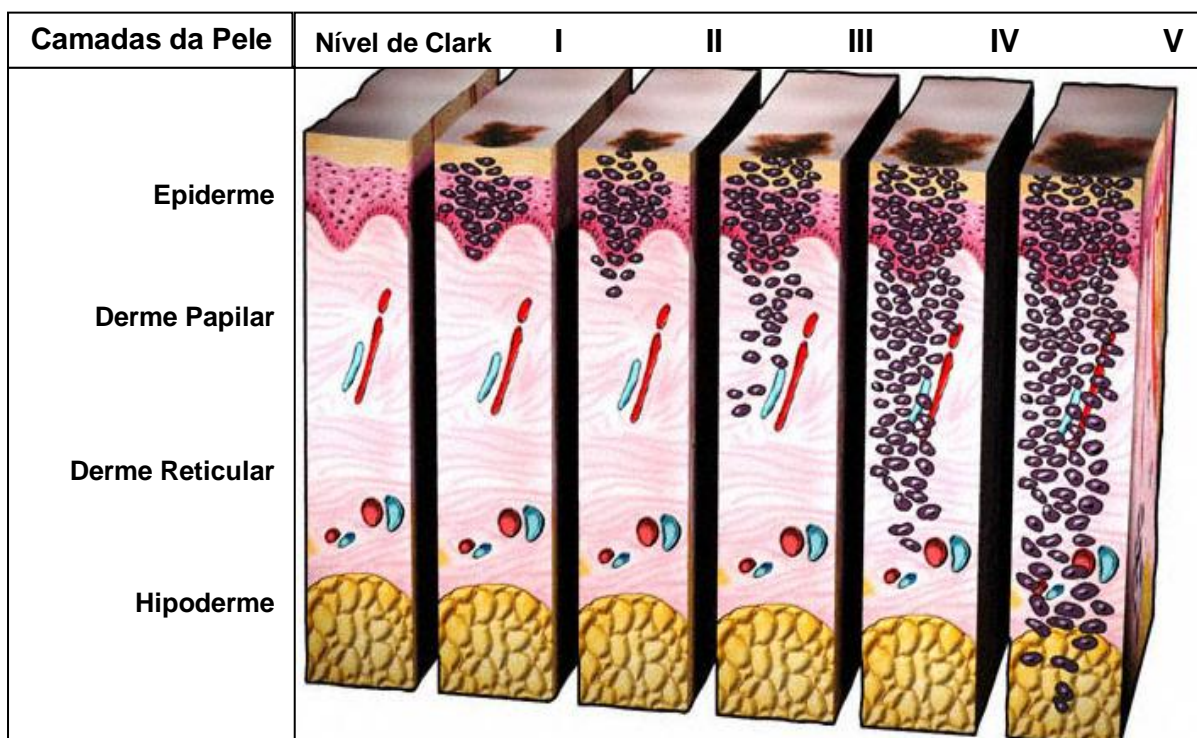
≤1mm de espessura quando o índice mitótico não pode ser avaliado; opcional para tumores >1mm de espessura (MICHALANY, 2014).



**Figura 9:** Desenho esquemático das camadas da pele de acordo com a espessura do tumor em milímetros segundo o índice de Breslow. **Fonte:** Adaptado de HALE, 2013

Os níveis de Clark representam a profundidade da invasão tumoral baseando-se nas estruturas anatômicas da pele e são definidos em níveis: nível I – células de melanoma confinadas na epiderme (melanoma *in situ*); nível II – células de melanoma que ultrapassam a membrana basal e ocupam parcialmente a derme papilar; nível III – células de melanoma preenchendo ou expandindo toda a derme papilar até o plexo vascular superficial sem, porém, invadir a derme reticular; nível IV – células de melanoma infiltrando a derme reticular; e o nível V – células de melanoma invadindo a hipoderme, como ilustrado na figura 10 (CLARK et al., 1969).

Esta classificação pelo nível de Clark não é tão objetiva e é menos reprodutível entre diferentes observadores do que a espessura de Breslow. É difícil saber exatamente onde termina a derme papilar e inicia a reticular. Assim, a distinção entre o Clark III e IV é, algumas vezes, problemática (BARNHILL, 2004).



**Figura 10.** Desenho esquemático do nível de invasão de Clark referente à localização do tumor em relação às diversas camadas histológicas da pele. **Fonte:** Adaptado de HALE, 2013.

O índice mitótico é considerado como segundo melhor fator prognóstico, pois é um forte indicador de proliferação tumoral. O prognóstico é melhor quando não há mitoses e pior quando há mais do que 6 mitoses por  $\text{mm}^2$ . A contagem é feita em uma área microscópica com maior número de mitoses aparente. É contado o número de mitoses em dez campos microscópicos de grande aumento (400 x), o que equivale a aproximadamente  $1\text{mm}^2$ . Nos microscópios mais modernos  $1\text{mm}^2$  equivale a cinco campos (MICHALANY, 2014).

A ulceração também é indicador prognóstico independente. É definida como a solução de continuidade do epitélio na superfície do tumor. Deve-se excluir, contudo, a ulceração devido a trauma prévio ou perda artefactual da epiderme. A presença de ulceração está associada ao risco significativamente aumentado de metástase. Existe clara correlação entre a espessura tumoral e a presença de ulceração. Conforme a espessura aumenta a presença de ulceração é proporcional. Os melanomas finos, com espessura menor que 1mm, apresentam 6% de presença de ulceração enquanto os melanomas espessos, maiores de 4mm, apresentam 63% (BALCH et al., 2001).

Outra característica essencial no laudo é a microssatelitose que é definida como focos descontínuos de tumor localizados num raio de 5cm do tumor primário,

constituídos por ninhos de tumor maiores do que 0,05mm na derme reticular e hipoderme, separados do componente invasivo do tumor por  $\geq 0,3\text{mm}$  de tecido normal. É encontrada em tumores espessos e associada com aumento do risco de recorrência local, metástases para linfonodos regionais e diminuição da sobrevida (LEON et al., 1991).

O padrão de crescimento do melanoma também deverá ser avaliado no laudo histopatológico que pode ser dividido em radial (horizontal) ou vertical. Na fase de crescimento radial as células do melanoma podem proliferar-se ao longo da membrana correspondendo ao melanoma *in situ*. As células podem digerir a membrana basal e atingir a derme papilar. Na fase de crescimento vertical é caracterizada pela presença de um ou mais agrupamento de células tumorais dérmicas que apresentam-se maior que o agrupamento tumoral intraepidérmico e/ou presença de qualquer atividade mitótica dérmica (DUNCAN, 2009).

Segundo Liu et al. (2006), a taxa de crescimento foi utilizada para definir o aumento do volume tumoral por unidade de tempo. O método para calcular essa taxa foi através da razão entre a espessura de Breslow e o tempo para desenvolvimento do melanoma. O melanoma nodular, melanomas ulcerados e com espessuras maiores que 1mm apresentaram maiores taxas de crescimento.

Outra característica avaliada no laudo anatomopatológico é a regressão que é definida como uma área focal onde é observado fibroplasia da derme papilar, acompanhada de proliferação de vasos sanguíneos dilatados, abaixo da qual há melanófagos e linfócitos por vezes formando faixa. Ausência de melanócitos anaplásicos na epiderme suprajacente. Clinicamente, esses achados se apresentam como áreas acinzentadas, brancacentas ou rosadas (DIMATOS et al., 2009).

Já a avaliação do infiltrado linfocitário tem se mostrado um excelente fator prognóstico independente, sendo de melhor prognóstico os casos onde o infiltrado linfocitário forma uma faixa abaixo da neoplasia ou penetra difusamente entre as células do melanoma. O prognóstico é pior quando a faixa é descontínua e a penetração entre as células do melanoma é focal (MICHALANY, 2014).

A ressecção cirúrgica acontece em dois momentos e que são avaliados pelo exame histopatológico, pois a cirurgia é o conceito fundamental no tratamento de melanoma cutâneo. No primeiro momento é realizada uma biópsia para confirmação diagnóstica e definição do estadiamento. Em seguida, com base nessa análise

inicial, é planejada a ampliação de margens e a detecção de linfonodo sentinela, quando indicada (ZAGER et al., 2011).

As margens de ressecções cirúrgicas deve respeitar o tamanho da lesão, pois em lesões suspeitas de tamanhos pequenos e médios deve-se realizar uma biópsia excisional que consiste na ressecção completa da lesão suspeita da pele, através de incisão geralmente fusiforme com margens laterais de segurança mínima 1 a 2mm, incluindo o tecido celular subcutâneo. Já em lesões maiores, localizações especiais (face/extremidade distal) ou naquelas cujo índice de suspeita para melanoma é remota e que a remoção completa pode causar sequelas importantes, a biópsia incisional poderia ser indicada (RICCARDI; GIORDANI, 2014). A biópsia incisional trata-se da retirada de um fragmento da lesão de pele, contendo parte do tumor com margens laterais positivas, que atinjam o tecido subcutâneo, devendo-se optar pela área mais espessa ou escura. Às vezes é necessário realizar biópsia em mais de uma região da neoplasia, pois o espécime deve representar o todo. A execução pode ser realizada com o bisturi, através de uma incisão elíptica ou “*punch*” (KONRAD; FABRIS; MELAO, 2011).

Uma vez a lesão sendo confirmada como melanoma, deve-se realizar a segunda etapa do tratamento cirúrgico, que tem como objetivo a retirada de algum possível tumor residual, que necessita ser realizada a partir da espessura de Breslow e deve-se realizar ampliação de margens da lesão primária. De modo geral, ficou estabelecida como: espessura do tumor *in situ* margens de 0,5cm a 1cm; melanomas de até 1mm de espessura podem ser ressecados com margem oncológica de 1cm; enquanto que melanomas com Breslow acima de 1mm a 2mm, requerem margens de 1 a 2cm. Melanomas mais espessos (Breslow de 2,1mm a 4mm) requerem margens de 2cm; melanomas com Breslow acima de 4mm requerem margens de 2cm ou mais (SANTOS; OLIVEIRA, 2014).

Melanoma primário com espessura igual ou maior que 1mm e Breslow com espessura a partir de 0,75mm a 0,99mm associado à ulceração e índice mitótico  $\geq 1$  deve-se realizar biópsia de linfonodo sentinela – em casos em que não há metástases regionais linfonodais ou à distância (WONG et al., 2012).

O linfonodo sentinela é o primeiro linfonodo responsável pela drenagem linfática na área entre o tumor primário e a cadeia linfática. O melanoma cutâneo apresenta disseminação por via linfática ou pela via hematogênica, os linfonodos regionais são os sítios mais comuns de metástases. O estudo do linfonodo sentinela

compreende 3 fases que são: linfocintilografia prévia, cirurgia radioguiada para a biópsia do linfonodo sentinela, que é a parte cirúrgica propriamente dita e o estudo anatomopatológico da peça removida (DIMATOS et al., 2009).

A linfocintilografia prévia consiste em uma injeção de radiofármacos (Dextran, Coloide Sulfúrico e o Fitato, todos marcados com Tecnécio-99m) que deve ser injetada intradermicamente, em 4 a 6 pontos ao redor da lesão ou da cicatriz resultante da biópsia excisional. O fármaco radioativo é então absorvido pelos mesmos linfáticos que drenam o local do tumor até os principais grupos de linfonodos responsáveis pela região. A cintilografia mostra o trajeto da cadeia linfática, as lesões suspeitas em trânsito, a localização e o número de linfonodos. Através de um contador gama, o linfonodo sentinela é localizado. De 4 a 24 horas após aplicação, o paciente é encaminhado ao centro cirúrgico, injeta-se o corante vital (azul patente) no mesmo local de injeção do radiofármacos e, com o auxílio de uma sonda de detecção de radiações (*gama-probe*). Este corante, bem como o radiotraçador, segue a mesma drenagem que uma célula tumoral metastática seguiria. Esse linfonodo é retirado e enviado para estudo anatomopatológico com cortes seriados em parafina, não sendo recomendado exame de congelação, em melanoma, pois os mesmos não são conclusivos (JANSEN et al., 2000; JÚNIOR MEIRA et al., 2015).

Se o linfonodo for positivo, nas análises das lâminas com coloração hematoxilina/eosina, independentemente do tamanho ou volume da metástase, esta será indicada como tratamento padrão a linfadenectomia terapêutica da cadeia acometida (OLIVEIRA FILHO et al., 2003). Em caso de negatividade, é realizada a imunohistoquímica utilizando a proteína S-100 (mais sensível), HMB-45 (mais específico) pela técnica do complexo avidina-biotina-peroxidase e Melan-A (ainda mais específico) para aumentar a chance de detecção e ocorre a linfadenectomia o mais precoce possível. Importante ser mencionado que a biópsia negativa de linfonodo sentinela é aquela que não evidencia metástases para a coloração com hematoxilina/eosina e imunohistoquímica (LANDMAN, 2014).



## 2.4 Estadiamento e tratamento do melanoma cutâneo

O estadiamento do melanoma tem o papel fundamental de fornecer importantes informações acerca do prognóstico do paciente e permitir o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas. Todo indivíduo com diagnóstico de melanoma deve ser estadiado conforme preconizado pela AJCC, de acordo com a classificação: **T** - tumor primário, **N** – comprometimento de linfonodo regional e **M** - metástases a distância – TNM (Tabela 1) (BALCH et al., 2009).

**Tabela 1:** Classificação TNM para o melanoma cutâneo.

<b>Tumor Primário (T)</b>	
Tis	Melanoma <i>in situ</i> (Clark nível I) (hiperplasia melanocítica atípica, displasia melanocítica importante, lesão maligna não invasiva)
T1	≤ 1,0 mm a. sem ulceração e mitoses < 1/mm <sup>2</sup> b. com ulceração ou mitoses ≥ 1/mm <sup>2</sup>
T2	> 1- 2,0 mm a. sem ulceração b. com ulceração
T3	> 2 – 4,0 mm a. sem ulceração b. com ulceração
T4	> 4,0 mm a. sem ulceração b. com ulceração
<b>Linfonodos Regionais (N)</b>	
N0	Ausência de metástases em linfonodo regional
N1	a. metástase microscópica <sup>1</sup> em apenas um linfonodo b. metástase macroscópica <sup>2</sup> em apenas um linfonodo
N2	a. metástase microscópica <sup>1</sup> em dois ou três linfonodos regionais b. metástase macroscópica <sup>2</sup> em dois ou três linfonodos regionais c. satélite* ou em trânsito** sem metástase linfonodal regional
N3	Metástase em quatro ou mais linfonodos regionais, ou linfonodos coalescentes, ou satélite(s)/metástase(s) em trânsito com metástase(s) em linfonodo(s) regional
<b>Metástases Distância (M)</b>	
M0	Sem metástases distantes
M1a	Metástases distantes na pele, subcutâneo ou linfonodos não regionais e nível sérico de desidrogenase láctica (LDH) normal
M1b	Metástases no pulmão e nível de desidrogenase láctica (LDH) normal
M1c	Metástases em outros locais, ou qualquer local com aumento do nível sérico de desidrogenase láctica (LDH)

<sup>1</sup> Metástases microscópicas são diagnosticadas após biópsia de linfonodo sentinela.

<sup>2</sup> Metástases macroscópicas são definidas como metástases linfonodais clinicamente detectadas e confirmadas patologicamente. \*Satélites são ninhos tumorais ou nódulos (micro ou macroscópicos) até 5 cm do tumor primário.

\*\*Metástases em trânsito envolvem a pele ou tecido subcutâneo com distância superior a 5 cm do tumor primário mas não além dos linfonodos regionais.

**Fonte:** BALCH et al., 2009.

A classificação TNM é indispensável para o tratamento e a avaliação prognóstica e leva em conta à espessura da lesão (Breslow), nível de invasão (Clark), presença ou não de ulceração microscópica, presença ou não de mitoses no componente dérmico (para os tumores de  $\leq 1\text{mm}$ ), ausência ou presença de metástases nos linfonodos e a distância (GIMOTY et al., 2007).

Há dois tipos de estadiamento para melanoma cutâneo, o estadiamento clínico que é denominado somente para aquele em que os linfonodos regionais foram avaliados apenas por exame clínico e/ou radiológico (Tabela 2) e o estadiamento patológico (Tabela 3) quando os linfonodos regionais foram microscopicamente examinados, após linfadenectomia parcial ou completa. Os estadiamentos clínicos e patológicos categorizam, portanto, os portadores de melanoma localizado sem evidência de metástase (Estádios I e II), em portadores de metástases regionais (Estádio III) e portadores de metástases distantes (Estádio IV) (JUNIOR SANCHES; SIQUEIRA, 2014).

**Tabela 2:** Estadiamento clínico do melanoma cutâneo.

<b>Estádios</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
0	Tis	N0	M0
I A	T1a	N0	M0
I B	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
II C	T4b	N0	M0
III	Qualquer T	N1	M0
	Qualquer T	N2	M0
	Qualquer T	N3	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

**Fonte:** JUNIOR SANCHES; SIQUEIRA, 2014.



**Tabela 3:** Estadiamento patológico do melanoma cutâneo.

<b>Estádios</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
0	Tis	N0	M0
I A	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1 – 4a	N1a	M0
	T1 – 4a	N2a	M0
IIIB	T1 – 4b	N1a	M0
	T1 – 4b	N2a	M0
	T1 – 4a	N1b	M0
	T1 – 4a	N2b	M0
	T1 – 4a	N2c	M0
IIIC	T1 – 4b	N1b	M0
	T1 – 4b	N2b	M0
	T1 – 4b	N2c	M0
	Qualquer T	N3	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

**Fonte:** JUNIOR SANCHES; SIQUEIRA, 2014.

O prognóstico dos indivíduos com melanoma localizado (Estádios I e II) é geralmente favorável quando comparado com os outros estádios. De acordo com o sistema de estadiamento do AJCC, é avaliado neste estágio a espessura do tumor primário, a presença de ulceração e o índice mitótico como fatores preditores independentes de sobrevida nesse grupo de indivíduos sendo utilizados para definir as categorias do tumor primário (T) (BALCH et al., 2009).

O estágio III determina o comprometimento regional, com envolvimento linfático, seja ele dos linfonodos regionais ou as lesões em trânsito. São subdivididos em: IIIA, IIIB e IIIC, levando em consideração também as características do tumor primário, como espessura do tumor e ulceração. Apesar do volume da doença metastática linfonodal já ter sido considerada como critério primordial para estratificação dos indivíduos, análises mais recentes demonstraram que, em indivíduos com metástases regionais, o número de linfonodos metastáticos

envolvidos é o fator preditor mais importante de sobrevida nesse estadiamento. Diante disso, o indivíduo é estratificado com linfonodos positivos em N1 (1 linfonodo metastático), N2 (2 a 3 linfonodos metastáticos) e N3 (4 ou mais linfonodos metastáticos). Com a maior acurácia e melhor disponibilidade dos testes imunohistoquímicos é possível detectar metástases linfonodais a partir da presença de apenas algumas células tumorais, com isso todos os linfonodos sentinela devem ser submetidos à imunohistoquímica. Sendo caracterizados por N1a – N3a indivíduos que apresentam micrometástases e N1b – N3b para os que apresentam macrometástases (GUEDES; BUZAID, 2014).

O Estádio IV está relacionado com comprometimento sistêmico, são consideradas as metástases à distância (sítios mais comuns a pele e tecido celular subcutâneo, linfonodos, pulmão, fígado e cérebro) e os níveis séricos da enzima desidrogenase láctica (LDH) (BALCH et al., 2009). Apresenta pior prognóstico de acordo com controles históricos e as taxas de sobrevida, em cinco anos, não ultrapassam 5% (MANOLA et al., 2000). É estratificado entre M1a (metástase para pele, tecido celular subcutâneo e/ou linfonodos não regionais), M1b (metástase pulmonar) e M1c (metástase visceral não pulmonar). A LDH elevada é um importante fator prognóstico de sobrevida. A população que apresenta essa enzima elevada também foi classificada como estágio M1c, independentemente do sítio de metástase (GUEDES; BUZAID, 2014).

Os avanços no tratamento do melanoma nos últimos anos não foram capazes de prorrogar, de maneira significativa, a sobrevida daqueles acometidos por doença metastática (GARBE et al., 2011). Os indivíduos que apresentam disseminação da doença para órgãos viscerais apresentam sobrevida de apenas 18% em dois anos. Por esta razão, a identificação prematura dos pacientes que apresentam risco elevado para a ocorrência de metástase é a principal arma estratégica para a redução da mortalidade por este tumor (BALCH et al., 2009).

O ano de 2011 marcou o início de uma nova era, em relação ao tratamento do indivíduo com melanoma metastático com a aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), utilizando as drogas Ipilimumab e Vermurafenib, porém, ainda não consolidado no que tange ao aumento de sobrevida (BELFORT; ALMEIDA, 2014). O acompanhamento de pacientes com melanoma visa à detecção precoce de recorrência ou metástases, porém, a possibilidade de tratamento e cura ainda é

muito baixa nestas situações. O diagnóstico precoce e o manejo adequado da lesão inicial são as melhores e únicas formas de se abordar o portador de melanoma, proporcionando qualidade de vida e aumento na sobrevida (BALCH et al., 2009).

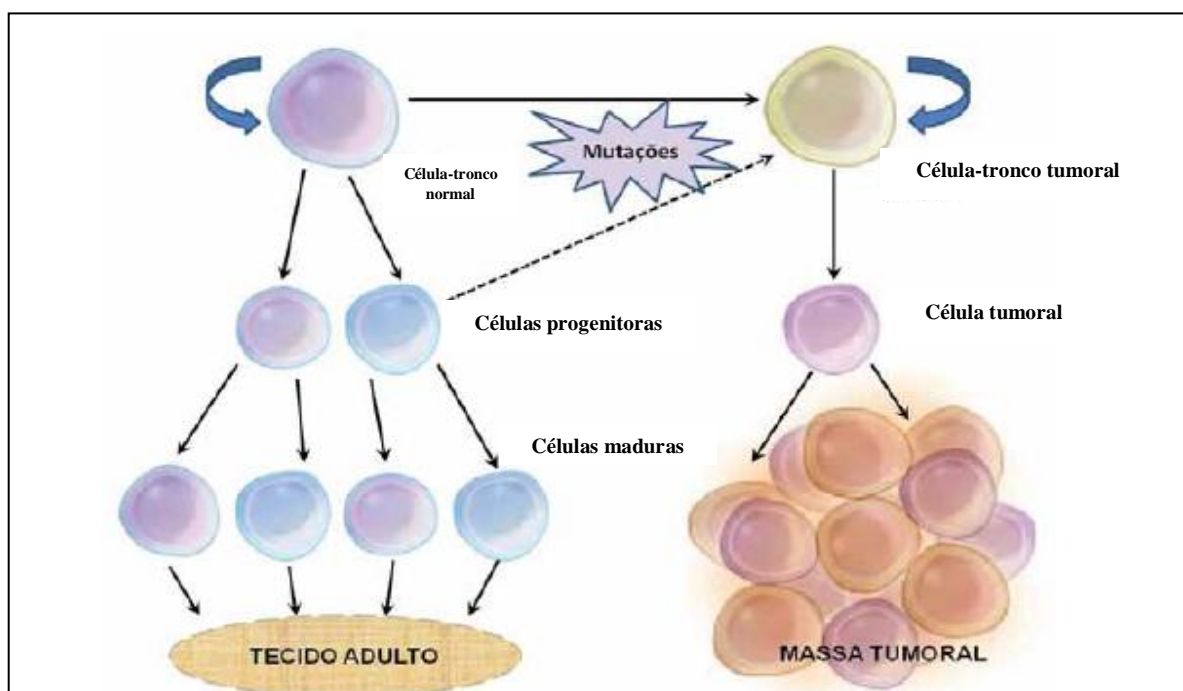
Avanços nas áreas da genética, imunologia e biologia molecular permitirão a seleção de indivíduos que responderão de forma específica à terapia. O melanoma representa um dos tumores mais estudados em relação ao seu comportamento biológico e sua biologia molecular. A melhor compreensão da biologia do melanoma poderá modificar os mecanismos de resistência das células tumorais e permitir que indivíduos, atualmente considerados incuráveis, passem a ter não só esperança, mas uma real possibilidade de cura. Entretanto, a terapia no melanoma avançado ainda permanece um desafio clínico constante.

## **2.5 Células-tronco tumorais**

O conceito de que o câncer surge a partir de um subgrupo de células tumorais com propriedades de células-tronco (do inglês, *cancer stem cells*, CSCs) que conduz a iniciação, a progressão e a recorrência dos tumores foi primeiramente proposto há quase 150 anos (GINESTIER et al., 2007). Considera-se que estas células tendem a acumular alterações genéticas ao longo do tempo, evadindo-se dos mecanismos de controle do microambiente e com isso, dão suporte à evolução tumoral (REYA et al., 2001), mas apenas recentemente com os avanços no conhecimento da biologia destas células permitiram o desenvolvimento de abordagens experimentais necessária para uma maior investigação desta hipótese (SELL, 2004; SHIPITSIN; POLYAK, 2008).

No modelo atual da oncogênese, os eventos que resultam na geração de um tumor podem ocorrer em qualquer célula. Nesse modelo a desregulação que leva ao crescimento exacerbado dos tumores é atribuída a uma série de alterações genéticas sequenciais e cumulativas, que resultam na ativação de genes responsáveis pela proliferação celular e no silenciamento de genes que inibem a proliferação e a morte celular (ISAACS, 1993; LOWE; LIN, 2000). Tais alterações podem ser resultados de uma variedade de fatores, tanto intrínsecos, como mutações genéticas herdadas ou erros aleatórios na replicação do DNA, quanto extrínsecos, por exemplo: dano e instabilidade genética induzida por radiação, substâncias químicas ou por infecção viral (LOWE; LIN, 2000).

Porém, de acordo com a hipótese das CSCs, também chamadas de células iniciadoras do tumor, neste modelo, os tumores contêm populações celulares heterogêneas, incluindo um pequeno subgrupo distinto de células de CSCs, as quais possuem a habilidade de iniciar e manter o crescimento tumoral, além de promover o surgimento de metástases (CREIGHTON et al., 2009; NICOLINI et al., 2011). Acredita-se que as CSC podem ser originar de células-tronco de tecidos normais, que gradualmente acumulam mutações e modificações epigenéticas ou de células progenitoras normais, as quais levam a uma alteração dos genes que regulam o processo normal de autorrenovação e capacidade proliferativa extensa que sofreu mutações originando as células-tronco tumorais essas mutações também pode ocorrer nas células progenitoras que fazem que as células crescem e se diferenciam para produzir o tumor primário. Assim como as células-tronco normais, as células-tronco tumorais podem se autorrenovar, dar origem a uma população heterogênea de células filhas e se proliferar incessantemente (Figura 11) (JORDAN; GUZMAN; NOBLE, 2006). Também segundo esta hipótese, as CSCs se manteriam como uma pequena fração das células do tumor e a progressão tumoral seria o resultado da disseminação destas células enquanto a recorrência do câncer seria causada pela resistência delas à terapia (REYA et al., 2001; POLYAK; HAHN, 2006).



**Figura 11.** Desenho esquemático evidenciando uma célula-tronco normal com habilidade de autorrenovação e capacidade proliferativa extensa que sofreu mutações originando as células-tronco tumorais. **Fonte:** Adaptado JORDAN; GUZMAN; NOBLE, 2006.

Os tumores serão iniciados e mantidos por esta subpopulação celular. As alterações genéticas presentes nas CSCs (como défices da reparação de DNA e mutações) originam uma instabilidade genômica responsável pela presença de um grande número de células tumorais semidiferenciadas. Durante a progressão do tumor, as CSC acreditam-se representam apenas 1% da carga tumoral, estando maioritariamente em fase quiescente. Pelo fato de serem indiferenciadas, não expressam na sua superfície celular proteínas associadas à diferenciação tecidual (biomarcadores) e como tal, não são alvos da terapia imune (SABATINO et al., 2009).

A principal característica das CSCs é sua propriedade de autorrenovação o que podem contribuir substancialmente para a manutenção do tumor, habilidade de gerar tumores a partir de pouquíssimas células, divisão celular lenta, habilidade de produzir uma progênie distinta fenotipicamente e a resistência seletiva a radioterapia e quimioterapia (REYA et al., 2001). As características de autorrenovação e diferenciação levam à produção de todos os tipos celulares de um tumor, gerando a heterogeneidade tumoral (CAMPBELL; POLYAK, 2007).

Além da capacidade de autorrenovação, existem outras características que incluem: capacidade auto regenerativa, proliferação lenta indefinida e diferenciação em múltiplos fenótipos celulares, ativação de vias antiapoptóticas (resistência apoptótica), indução da angiogênese e resistência a drogas (pela expressão da telomerase ativa e elevada atividade do transporte membranar) e a habilidade de migrar e se espalhar pelo organismo causando metástases (WICHA; LIU; DONTU, 2006).

As células com propriedades de CSCs foram identificadas primeiramente por Bonnet e Dick em 1997, quando mostraram que uma pequena população de células oriundas de leucemia mielóide aguda humana, que expressavam algumas moléculas de superfície celular associados com células tronco hematopoiéticas normais, eram capazes de iniciar a leucemia em camundongos, diferentemente das demais células (BONNET; DICK, 1997) e também marcadores de superfície característicos das CSCs também têm sido identificadas e isoladas em leucemia mielóide crônica (HOPE; JIN; DICK, 2004; EISTERER et al., 2005). O câncer de mama foi o primeiro carcinoma humano a partir do qual uma subpopulação de células-tronco foi isolada (AL-HAJJ et al., 2003).

Este mesmo princípio tem sido utilizado para identificar as CSCs em tumores sólidos como: câncer ósseo (GIBBS et al., 2005), câncer cerebral (SINGH et al., 2004), câncer de próstata (COLLINS et al., 2005), mieloma múltiplo (MATSUI et al., 2004), câncer de cólon (DALERBA et al., 2007), câncer de pâncreas (LI et al., 2007) e câncer de cabeça e pescoço (PRINCE et al., 2007) e melanoma (FANG et al., 2005).

Diversas evidências sugerem a existência CSCs para o melanoma (SCHATTON et al., 2008; ZABIEROWSKI; HERLYN, 2008). Segundo Sabatino e colaboradores (2009), chegaram-se à conclusão de que o melanoma contém uma subpopulação celular que é considerada a fonte do tumor primário e de novos nódulos tumorais e que poderia ser grande responsável também pela resistência à terapêutica e recorrências tumorais.

Estudos evidenciaram que as células-tronco tumorais são resistentes à radioterapia e à quimioterapia, podendo explicar o reaparecimento da doença, visto que, além de não eliminá-las completamente, quantidades mínimas de células-tronco tumorais podem repovoar um tumor (BACCELLI; TRUMPP, 2012; SATPUTE et al., 2013). Os tratamentos terapêuticos além de não serem totalmente eficazes ainda podem provocar mutações genéticas e a expansão dessas células, resultando em uma terapia de resistência adquirida. Por isso, caracterizar as células-tronco tumorais e identificar as vias moleculares que mantêm essas células é um passo importante para a eficácia do tratamento (RYCAJ; TANG, 2014).

A terminação “células-tronco tumorais” refere-se às propriedades funcionais das células e não à sua origem (SINHA et al., 2013). A origem precisa das células-tronco tumorais é ainda uma questão controversa. Existem três hipóteses principais para a origem das células-tronco tumorais: 1 - transformação maligna de células-tronco normais - é proposto que as células-tronco tumorais podem derivar de células-tronco normais que adquiriram mutações genéticas e epigenéticas e perderam a sua capacidade de autorregulação da proliferação celular (TODARO et al., 2007); 2 - desdiferenciação de células tumorais maduras a partir da transição epitélio-mesenquimal – a transição epitélio-mesenquimal é considerada um processo importante na evolução neoplásica, uma vez que a célula epitelial assume o fenótipo de uma célula mesenquimal e ganha a capacidade de mobilidade e invasão (SATPUTE et al., 2013).

As células-tronco tumorais podem produzir células progenitoras que por sua vez geram diferentes subpopulações de células tumorais. As células progenitoras são células parcialmente diferenciadas e que se dividem para produzir células maduras. As mutações adicionais em células progenitoras levariam à transformação e propiciariam as células a voltarem a adquirir o potencial de autorrenovação das células-tronco tumorais por desdiferenciação (ISLAM et al., 2015); 3- células tumorais pluripotentes induzidas - origem das células-tronco tumorais estaria relacionada com o desenvolvimento recente de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS). Caracteriza-se pela conversão de células somáticas normais em células-tronco tumorais por reprogramação celular, desta forma, a expressão induzida por fatores de transcrição (OCT4, SOX2, NANOG e KLF4) em células somáticas normais podem produzir células-tronco tumorais (TAKAHASHI, YAMANAKA, 2006; ISLAM et al., 2015).

A identificação de marcadores de células-tronco tumorais e das suas funções nos mecanismos moleculares da tumorigênese é essencial para a compreensão do comportamento da célula neoplásica no microambiente tumoral e para o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos. O conhecimento das células-tronco tumorais e seus marcadores podem ajudar a diferenciar os tumores pelo tipo, levando em consideração a sua localização. Também é possível avaliar o grau de agressividade do tumor de acordo com o fenótipo destas células (MOGHBELI et al., 2014; KOBAYASHI; NORONHA, 2015).

Diversos marcadores de células-tronco tumorais vêm sendo estudado e talvez nem exista um marcador universal, já que eles variam entre cada tipo de tumor e até de paciente para paciente os principais estudados são: OCT4, NANOG e SOX2 têm sido identificados como passíveis de utilização para a informação diagnóstica e prognóstica em câncer de pulmão, mama, carcinomas de cabeça e pescoço, dentre outros (MAJOR; PITTY; FARAH, 2013; DAI et al., 2014; PAPAGERAKIS et al., 2014).

Mas, até o momento nenhum marcador específico foi encontrado permitindo a identificação das células-tronco tumorais para cada tipo de câncer. Por conseguinte, há uma tendência para a utilização de várias combinações de marcadores a fim de atingir uma alta especificidade (SZAFAROWSKI, SZCZEPANSKI, 2014). As populações de células-tronco tumorais são definidas e sinalizadas por biomarcadores que não são exclusivos, mas eventualmente podem ser usados para

a sua detecção tanto no tumor primário quanto nas lesões metastáticas. Acredita-se que o melhor conhecimento das células-tronco tumorais irá influenciar na decisão terapêutica e na modalidade de tratamento, o que por fim, terá influência direta no prognóstico dos tumores malignos (BHAIJEE et al., 2012).

## **2.6 Marcadores de pluripotência - *POU5F1/OCT4* e *NANOG***

O OCT4 (octamer-binding transcription factor 4), é um fator de transcrição também conhecido como OCT3, OCT3/4, OTF3 ou NF-A3, é uma proteína codificada pelo gene *POU5F1* (Família POU - Pit-Oct-Unc, classe 5, fator de transcrição 1) (ZEINEDDINE et al., 2014).

O gene *POU5F1* (OMIM-164177) está localizado no braço curto do cromossomo 6 em humanos e no cromossomo 17 em ratos, foi descoberto em 1990, e está expresso em células tronco embrionárias, células germinativas e células-tronco humanas adultas e é encontrado silenciado na maioria das células somáticas (CHEN et al., 2015; CURRY et al., 2015). É responsável pela autorrenovação e manutenção da pluripotência das células-tronco (GERRARD et al., 2005).

A proteína OCT4 consiste em 3 domínios: N-terminal, POU e C-terminal. O domínio POU é composto por dois subdomínios estruturalmente independentes, um composto por 75 aminoácidos na região amino-terminal POU-específico e o outro subdomínio é constituído por 60 aminoácidos na região carboxi-terminal. Ambos os domínios fazem contato específico com o DNA e são conectados por um ligante de 17 aminoácidos, totalizando 152 aminoácidos sendo sintetizado e transportado para o núcleo por meio do sinal de localização nuclear (WU, SCHOLER, 2014).

Essa proteína participa de duas etapas cruciais na formação do embrião; a primeira, na etapa da formação da mórula com desenvolvimento da massa celular interna, que é pluripotente e do trofoectoderma e a segunda, no estágio de pré-implantação, com formação do epiblasto pluripotente e do ectoderma primitivo (HAMMACHI et al., 2012).

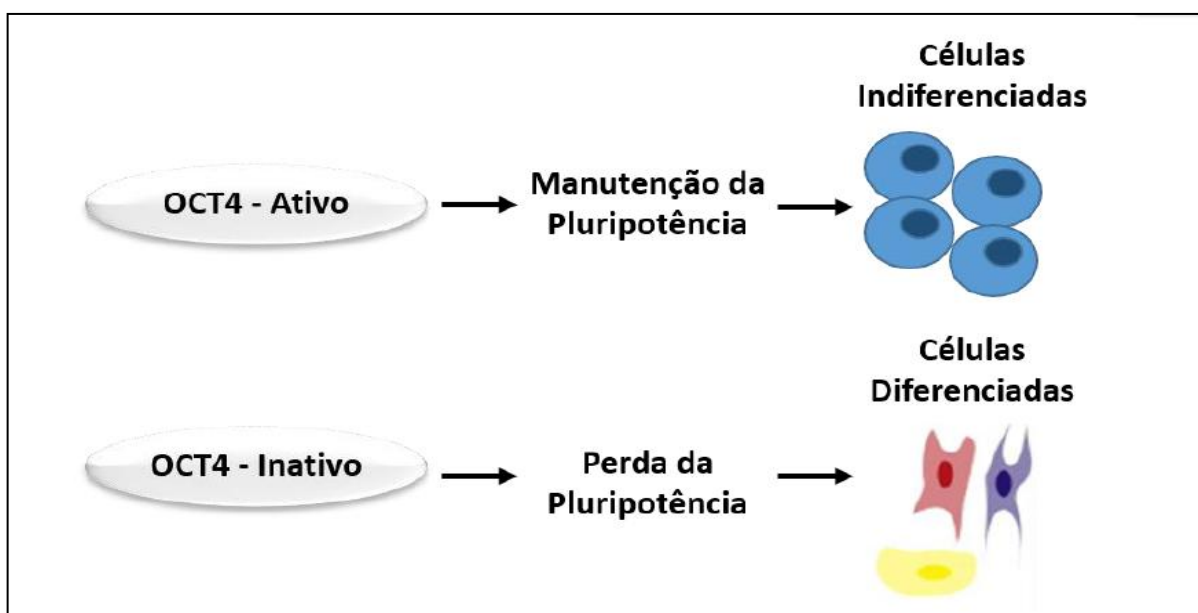
O OCT4 possui pelo menos 3 isoformas de transcritos (OCT4A, OCT4B e OCT4B1), sendo o OCT4A responsável pelas características de tronco. A função do OCT4B1 ainda é desconhecida, apesar de se acreditar que também atue como fator tronco (WANG; DAI, 2010). E a isoforma OCT4B contém entradas alternativas do ribossomo (IRES) que possibilitam a tradução para três isoformas proteicas OCT4B-



265, OCT4B-190 e OCT4B-164, sendo a proteína OCT4B-190 relacionada ao stress celular (GAO et al., 2010).

O OCT4 está envolvido na manutenção da pluripotência e autorrenovação das células-tronco embrionárias indiferenciadas (HUANG et al., 2014; KOO et al., 2015). Também é considerado o principal “ponta pé” genético no estabelecimento da totipotência/pluripotência durante o ciclo da vida em mamíferos e presume-se, que seja o mais importante gene no circuito molecular da pluripotência (WU; SCHOLER, 2014).

A expressão do OCT4 permite que as células permaneçam no estágio indiferenciado, podendo se multiplicar infinitamente sem que ocorra a diferenciação. No entanto, a diminuição da expressão deste fator de transcrição resulta em diferenciação das células-tronco e por consequência, gera a perda de pluripotência como evidenciado na figura 12 (HAMMACHI et al., 2012).



**Figura 12.** Desenho esquemático evidenciando a função do OCT4 como regulador da pluripotência das células-tronco. A expressão do OCT4 permite que as células permaneçam no estágio indiferenciado e quando o mesmo é inativado resulta em diferenciação das células-tronco e por consequência, gera a perda de pluripotência. **Fonte:** Adaptado de HAMMACHI et al., 2012.

O OCT4 também tem sido implicado com um marcador de células-tronco tumorais (ATLASI et al., 2007; KIM; NAM, 2011). A superexpressão de OCT4 foi detectada em tumores de próstata, nas células-tronco tumorais da mama, nas células-tronco tumorais do cérebro e em células de iniciação tumoral em modelos de ratos (BEN-PORATH et al., 2008; DARINI et al., 2012; TSAI et al., 2014). Pesquisas

recentes relataram que OCT4 é utilizado para a identificação precoce de células-tronco tumorais em vários tipos de câncer, incluindo ovário, câncer de mama, bem como câncer de cabeça e pescoço, sendo associado com a progressão tumoral (THOMAS; CHENG, 2005; KRISHNAMURTHY; NOR, 2012; HASSIOTOU et al., 2013; TSAI et al., 2014; RAVINDRAN et al., 2015; CAI et al., 2016).

A reexpressão deste gene em células de tumorais pode ter um importante papel na carcinogênese, além de fornecer um possível mecanismo pelo qual células cancerosas adquirem ou mantêm o fenótipo de resistência a drogas. Linn *et al.* (2010), relacionaram a superexpressão do gene OCT4 com a resistência a drogas em linhagem de câncer de próstata. Além disso, a superexpressão desse gene estava acompanhada da ativação de um conjunto de seus genes alvos, incluindo os fatores de transcrição envolvidos na autorrenovação das células-tronco como SOX2 e NANOG.

O NANOG (OMIM-607937) é uma proteína homeobox que funciona como um fator de transcrição responsável pela manutenção da pluripotência, é expresso em células-tronco embrionárias, multipotentes e também em células neoplásicas. Seu nome é uma referência a *Tir Nan Nog*, chamada em inglês de *Land of Eternal Youth* que significa "Terra da Eterna Juventude" segundo a mitologia celta (DARR; MAYSHAR; BENVENISTY, 2006).

Nos seres humanos, esta proteína é codificada pelo gene NANOG que está localizado no braço curto do cromossomo 12. Sua fundamental importância é principalmente a determinação do plano de corpo e a segmentação do corpo da célula, atuando como um regulador de ampla variedade dos genes alvo na fase inicial do desenvolvimento embrionado (CHAMBERS et al., 2003). Tanto em humanos como em camundongos sua supressão induz a diferenciação para tecidos extra-embrionários (HYSLOP et al., 2005) atuando, principalmente, mantendo a capacidade de autorrenovação destas células e o seu estado indiferenciado (DARR; MAYSHAR; BENVENISTY, 2006).

O NANOG atua na transição de células pluripotentes na massa celular interna para os epiblastos. Quando OCT4 e NANOG estão em atividades são capazes de realizar pluripotência em células que suportam a autorenovação individual (ALLOUBA et al., 2015). O produto do gene *POU5F1/OCT4* não é necessário para a expressão do gene NANOG, porém o NANOG não pode atuar na ausência de OCT4 (ALBERIO; CAMPBELL; JOHNSON, 2006). Nota-se que estes genes, isolados ou

em associação, são responsáveis pela expressão de mais de 2.000 outros genes envolvidos nos processos de autorrenovação, de manutenção da plasticidade e, logo, pluripotência das células-tronco (MASUI et al., 2007).

Em embriões de ratos já está bem definido que a pluripotência é mantida primariamente pelos seguintes genes: *POU5F1/OCT4*, *SOX2* e *NANOG* (COWAN et al., 2004). Esses genes são ativados por fatores de transcrição próprios que também se ligam a genes responsáveis em codificar componentes que irão inibir vias essenciais para que o desenvolvimento. A expressão de *OCT4* é considerada um marco importante para a identificação de células pluripotentes do rato. O *OCT4* é expresso em células pluripotentes durante as clivagens, no epiblasto no início da fase pós implantação do embrião e em células-tronco embrionárias em cultivo (PESCE; SCHOLER, 2001).

Apesar de gene *POU5F1/OCT4* ser necessário para a manutenção da pluripotência de células-tronco embrionária, ele sozinho não é excluyente de diferenciação. Blastocistos humanos em diferentes estágios de desenvolvimento apresentam variados níveis de expressão do *OCT4*, também encontrado em células já diferenciadas, como as do trofoblasto (CAUFFMAN et al, 2005). Já o gene *NANOG* também tem se mostrado muito importante, pois a ausência de sua transcrição induz a diferenciação celular para linhagens de endoderme extra-embrionária, enquanto uma expressão 50 a 60% menor induz a geração de vários tipos de tecidos, ativando genes da endoderme, mesoderme e ectoderme (HATANO et al., 2005). Em conclusão, os transcritos *OCT4*, *NANOG* e *SOX2* exercem um papel essencial e coordenado, bloqueando genes que, na ausência dos seus transcritos, desencadeiam diferenciação (ZANGROSSI et al., 2007).

Estudos têm demonstrado que a elevada expressão de *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* em conjunto ou separadamente, está associada a processos tumorigênicos como metástase tumoral e recorrência após quimioterapia e radioterapia em diferentes tipos de câncer (CHANG et al., 2008; MAJOR, PITY, FARAH, 2013; KOO et al., 2015).

Segundo Xie e colaboradores (2013), relataram que a proteína homeodomínio *NANOG* que atua com *OCT4* e *SOX2* encontraram-se suas expressões aumentada em alguns tecidos com células cancerosas, relatando também, a utilização como biomarcador de prognóstico em carcinomas colorretais e adenocarcinomas de pulmão. A expressão da proteína *OCT4* e *NANOG* também mostrou-se associada

com mau prognóstico e risco de metástase em alguns tipos de câncer como: pulmão, pâncreas, mama, cérebro e fígado (CHIOU et al., 2010; GUO et al., 2011; LING et al., 2012; LU et al., 2013; WANG et al., 2014; YIN et al., 2015).

Segundo Borrull e colaboradores (2012), a superexpressão de OCT4 e NANOG em células de melanoma aumenta a capacidade destas células a transmigração através do ganho da motilidade amebóides, levando a uma maior capacidade de invasão e agressividade. Acredita-se que o melhor conhecimento das células-tronco tumorais bem como a expressão de OCT4 e NANOG irá influenciar na decisão terapêutica e na modalidade de tratamento, o que por fim, terá influência direta no prognóstico do melanoma cutâneo.

### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar os fatores epidemiológicos, clínico-patológicos e expressão da proteína OCT4 e NANOG em amostras de melanoma cutâneo.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Descrever as características epidemiológicas e clínico-patológicas do melanoma na população estudada;
- Determinar a sobrevida global dos pacientes com melanoma cutâneo;
- Correlacionar a sobrevida dos pacientes com melanoma cutâneo de acordo com o índice de Breslow; Clark e metástase;
- Determinar por curva ROC o ponto de corte para a marcação positiva das proteínas OCT4 e NANOG;
- Analisar o prognóstico e a sobrevida de acordo com a expressão nuclear e citoplasmática da proteína OCT4;
- Analisar o prognóstico e a sobrevida de acordo com a expressão citoplasmática da proteína NANOG.

### 4.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás – CEP/UFG, com parecer número CAAE 44990415.4.0000.5083 (ANEXO A) e aprovado também pelo Comitê de Ética em pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás – CEP/ACCG, com parecer número CAAE 44990415.4.3001.0031 (ANEXO B).

### 4.2 Tipo de estudo e casuística

Estudo epidemiológico, retrospectivo e analítico, que utilizou dados epidemiológicos, clínico-patológicos e detecção por imunoistoquímica das proteínas OCT4 e NANOG em amostras de melanoma cutâneo. Blocos de parafina contendo espécimes de melanoma cutâneo foram obtidos de 102 pacientes diagnosticados no Hospital Araújo Jorge (HAJ), em Goiânia, no ano de 2004 a 2008.

### 4.3 Seleção das amostras

Do total de casos registrados e diagnosticados nos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do HAJ no período de 2004 a 2008 foram selecionados 102 casos com melanoma cutâneo para a realização da análise imunoistoquímica de OCT4 e NANOG, os quais continham material suficiente para os cortes histológicos. Para estudo de sobrevida, foram selecionados pacientes com seguimento de até 60 meses, com óbito registrado e verificado no Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), tendo o melanoma como a causa morte dos pacientes. Os critérios de inclusão foram: paciente com diagnóstico histopatológico de melanoma cutâneo, dados epidemiológicos e clínico-patológicos disponíveis nos prontuários, blocos de parafina contendo o tumor disponível e suficiente para análise e blocos disponíveis anteriores à radioterapia e quimioterapia. Foram excluídos do estudo, prontuários incompletos, blocos que não apresentaram boa condição de armazenamento e material insuficiente para a análise imunoistoquímica.

As lâminas preparadas a partir de cada bloco foram coradas com hematoxilina e eosina e também foram realizados cortes histológicos para análise da imunoistoquímica com o anticorpo anti-OCT4 e anti-NANOG. Todos os casos foram avaliados pelo patologista para a análise da expressão da proteína OCT4 e NANOG que desconhecia os dados clinicopatológicos. Os tumores foram classificados de acordo com a Organização Mundial de Saúde para melanoma cutâneo (CID 10 - C43). Os dados foram coletados dos respectivos prontuários e dos laudos histopatológicos que incluíram: idade, data do diagnóstico, localização do tumor, história familiar de melanoma, tipo histológico (extensivo superficial, nodular, lentigo maligno, acral/mucosa e inclassificável), comprometimento de margens, sinais de regressão, ulceração, infiltração linfocitária peritumoral, índice mitótico, satélites microscópios, espessura do tumor – Breslow, nível de Clark, comprometimento de linfonodos regionais, metástases à distância e seguimento do paciente. Os dados foram registrados na ficha de avaliação dos aspectos clínicos e histopatológicos do melanoma (APÊNDICE A). O grupo foi investigado para a expressão de OCT4 e NANOG, os aspectos clínicos e histopatológicos, bem como a sobrevida dos pacientes em cinco anos.

#### **4.4 Estudo imunohistoquímico**

Para a análise da imunoistoquímica foi utilizado o anticorpo monoclonal de coelho de anti-OCT4 (Abcam [ab109183] 1:1000) e o anti-NANOG (Abcam [ab109250] 1:250) e o método de imunoperoxidase associada a polímeros (Kit comercial Novolink-Novocastra Max Polymer Detection System – Leica). A análise imunoistoquímica para OCT4 e NANOG foi realizada em todas as amostras. Todos os espécimes de melanoma cutâneo foram fixados em formol a 10% e emblocados em parafina, referentes aos casos selecionados para este estudo. Foram submetidos a cortes histológicos de 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas silanizadas e desparafinizados em xilol, em temperatura ambiente e depois reidratada numa série de lavagens em álcool (100%, 80% e 50%, respectivamente). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em peróxido de hidrogênio 10V a 3% durante 10 minutos, e em seguida, as lâminas foram lavadas com água corrente e enxaguadas com tampão fosfato salino (PBS). Em seguida, submetidos à recuperação antigênica pelo calor úmido, em panela de pressão elétrica (Britânia/

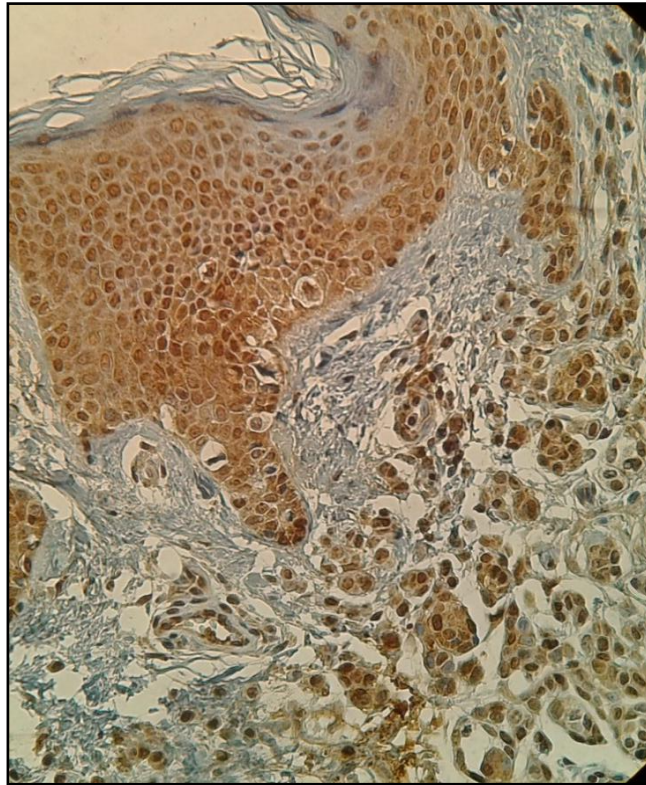
panela de pressão elétrica 5L), durante 7 minutos, utilizando o citrato 10mM/pH6,0. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente para resfriamento por cerca de 20 minutos e lavadas em água corrente. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas a 4°C, durante a noite, com o anticorpo primário. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em água corrente e PBS e incubadas durante 30 minutos com o polímero (imunoconjugado de IgG anti-coelho). Depois de uma nova lavagem com água corrente e PBS, a reação foi revelada com tetra-hidrocloreto de 3,3'-diamino-benzidina (DAB), por 5 minutos, e as lâminas levemente contracordadas com hematoxilina de Harris. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em álcool (3 imersões) e realizado diafanização no xilol (3 imersões) e montadas com lamínula usando Entellan Novo (Merk).

#### **4.5 Análise do perfil imunoistoquímico**

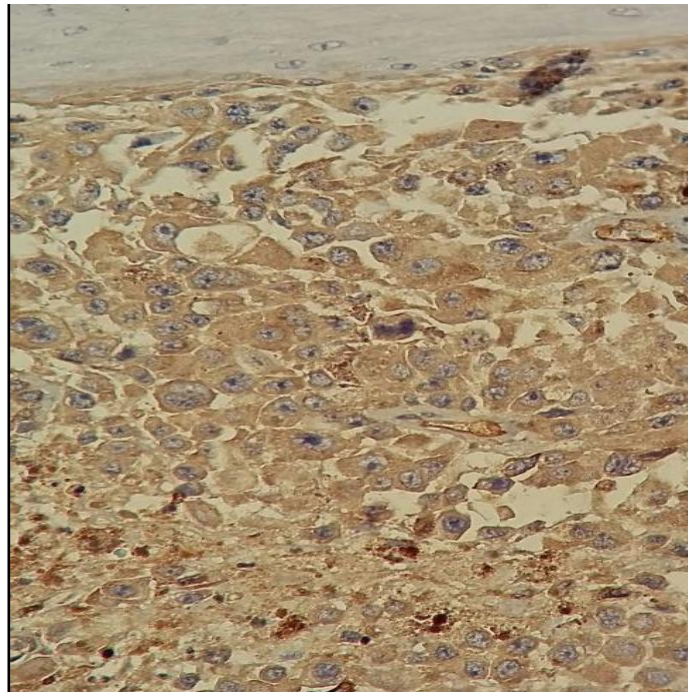
Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, cada espécime foi analisada à microscopia óptica por um patologista que desconhecia os dados clínicos utilizando uma ficha de avaliação imunoistoquímica para cada amostra (APÊNDICE B). Para avaliação das imunoexpressões de OCT4 e NANOG foi realizada uma análise semiquantitativa utilizado para OCT4 e NANOG uma adaptação da metodologia descrita nos trabalhos de GE et al. (2010). Sob aumento de 100x cada lâmina foi examinada em sua totalidade onde 05 campos histológicos foram selecionados aleatoriamente sob um microscópio de luz (Microscópio Nikon Eclipse E200 Japan Co., Tokyo, Japan) e sob aumento de 400x foi estimada a proporção de células positivas para OCT4 e NANOG na área do tumor.

Para o anticorpo anti-OCT4 e anti-NANOG foram consideradas positivas as células que exibiram coloração acastanhada nuclear e/ou citoplasmática (Figura 13 e Figura 14). Vários estudos evidencia a expressão de OCT4 e NANOG no núcleo e no citoplasma em diferentes tipos tumorais (CHIOU et al., 2010; GUO et al., 2011; MIYAZAWA et al., 2014).



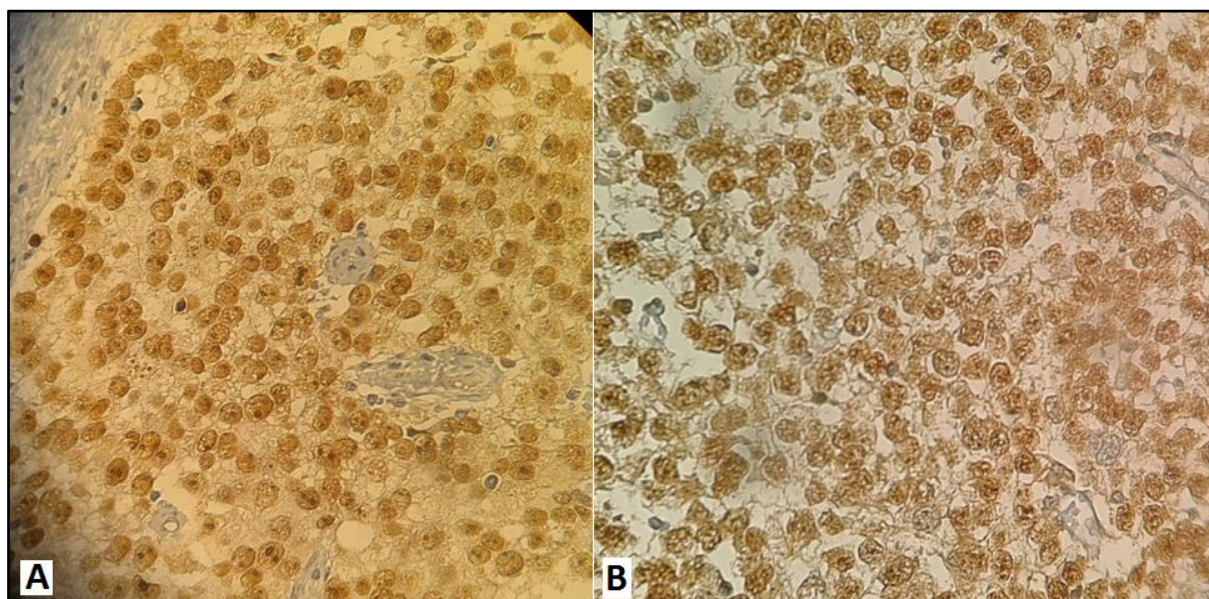


**Figura 13:** Fotomicrografia de células neoplásicas de melanoma cutâneo exibindo positividade difusa e intensa para núcleo e difusa fraca para citoplasma (OCT4 – imunohistoquímica, 400X). **Fonte:** arquivo pessoal.



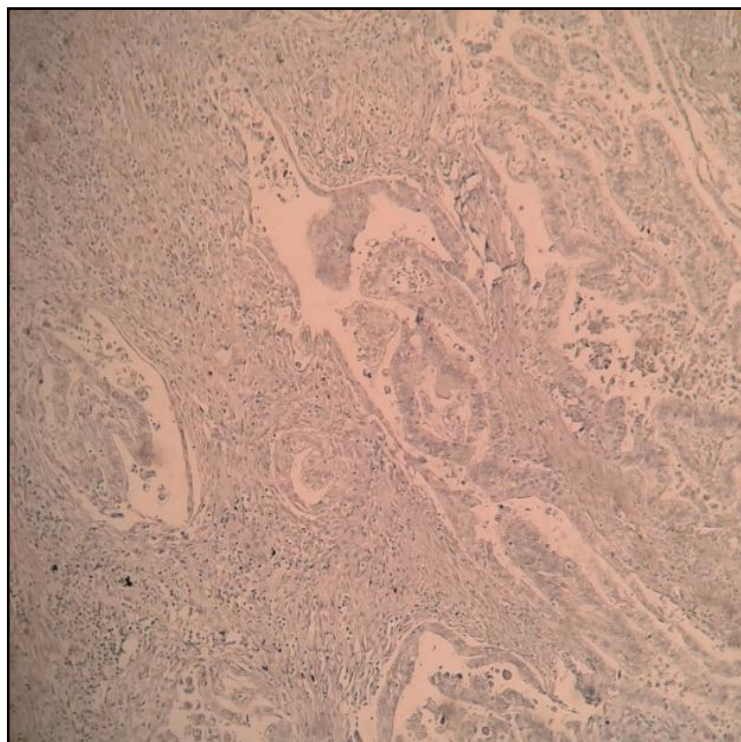
**Figura 14:** Fotomicrografia de células neoplásicas de melanoma cutâneo exibindo positividade difusa e intensa para citoplasma e difusa fraca para núcleo (NANOG – imunohistoquímica, 400X). **Fonte:** arquivo pessoal.

Um controle positivo foi incluído em cada reação realizada, para OCT4 e NANOG foi utilizado o seminoma (Figura 15) de acordo com a indicação do fabricante do anticorpo. Como controle negativo para OCT4, foi usado hepatocarcinoma (Figura 16) e para NANOG, tecido de cólon sem malignidade (Figura 17). Todas as reações foram processadas nas mesmas condições ambientais.

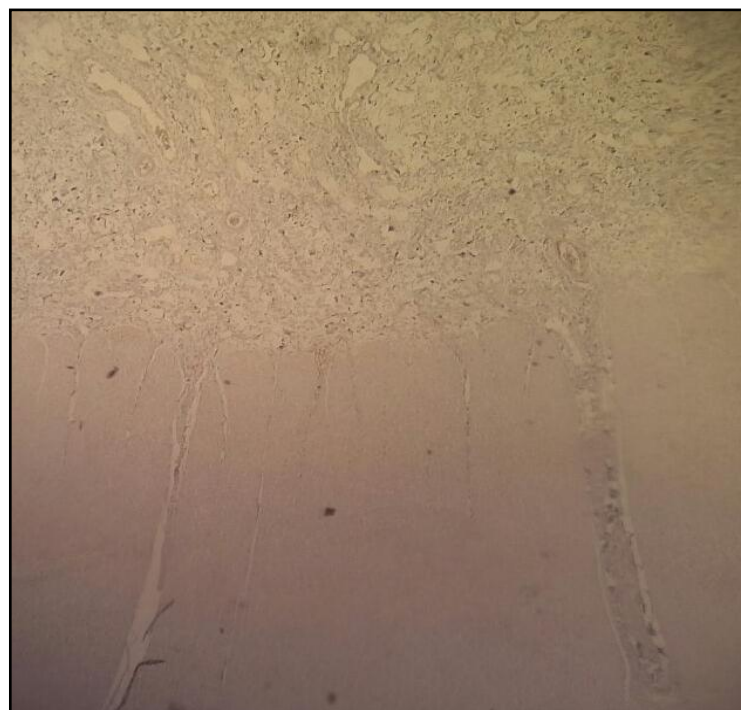


**Figura 15:** Fotomicrografia de células tumorais germinativas de seminoma positivas (marcação nuclear difusa, imunoistoquímica, 400X). A) OCT4, B) NANOG. **Fonte:** arquivo pessoal.



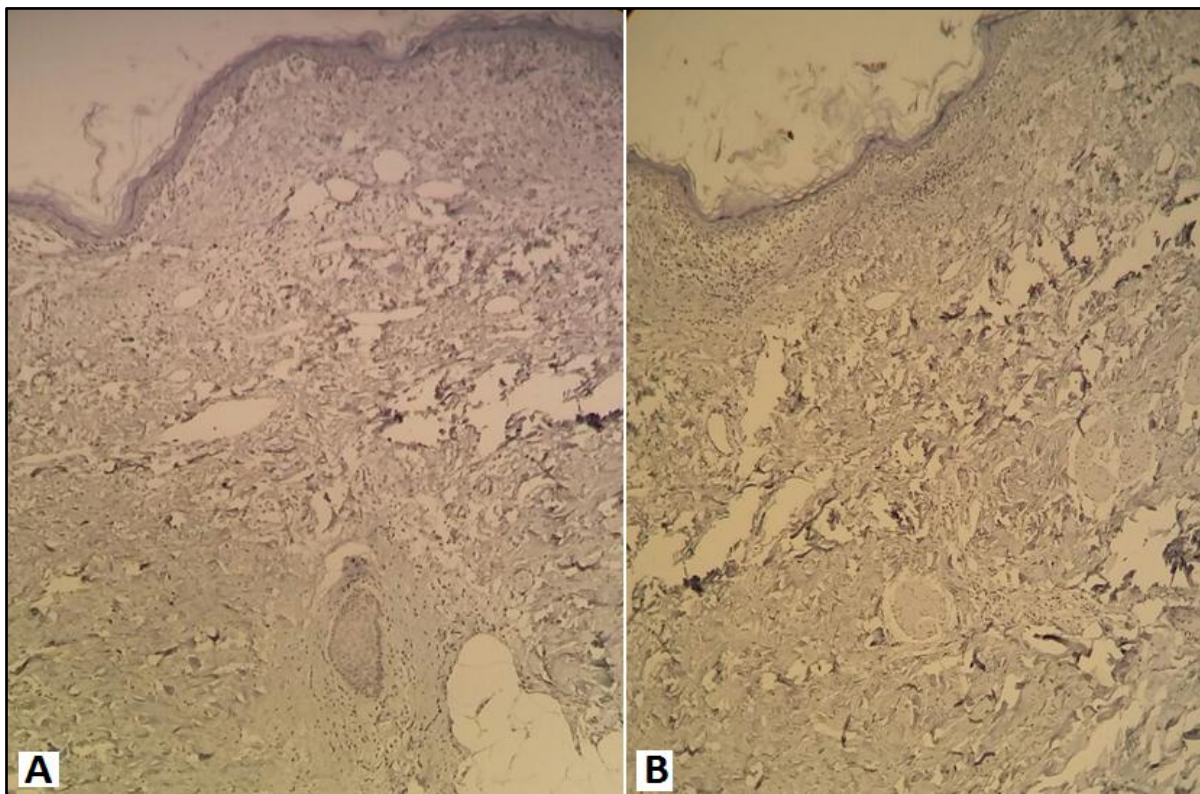


**Figura 16:** Fotomicrografia de células tumorais de hepatocarcinoma exibindo negatividade de núcleo e citoplasma para OCT4 (imunoistoquímica, 400X). **Fonte:** arquivo pessoal.



**Figura 17:** Fotomicrografia de colón sem malignidade exibindo negatividade de núcleo e citoplasma para NANOG (imunoistoquímica, 400X). **Fonte:** arquivo pessoal.

Como controle negativo para testagem dos anticorpos, omitiu-se o anticorpo primário, não sendo evidenciada nenhuma marcação nos casos avaliados (Figura 18).



**Figura 18:** Fotomicrografia de células neoplásicas de melanoma cutâneo não evidenciando imunorreatividade na omissão do anticorpo primário. A) OCT4, B) NANOG. **Fonte:** arquivo pessoal.

#### 4.6 Análises estatísticas

O programa Microsoft® Excel 2007 foi usado para tabulação dos dados e a análise estatística foi realizada pelo programa SPSS® for Windows®, versão 16.0.

Para avaliar a influência entre as possíveis associações da expressão de OCT4 e NANOG foram consideradas as variáveis epidemiológicas e clínico-patológicas dos pacientes com melanoma cutâneo através de Análise Univariada (*Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%), adotado o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e teste Exato de Fisher. Foi empregada a análise de sobrevida usando testes de log-rank e ilustrados com gráficos de Kaplan-Meier. Foi utilizado como nível de significância o valor 5% ( $p < 0,05$ ) para todas as análises.

As variáveis preditoras ou independentes no estudo foram: índice de Breslow, nível de Clark, ulceração, metástases, óbito por melanoma e óbito por outras causas. As variáveis de desfecho foram: a expressão das proteínas OCT4 e NANOG.

Para análise da expressão de OCT4 (nuclear e citoplasmática) e NANOG (citoplasmática) foram necessários calcular o ponto de corte (*cut off*) realizada através da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). A análise da curva ROC pode provir de uma tabela de contingência 2 x 2. Os valores calculados para estabelecer o *cutoff* foram selecionados com base na marcação imunoistoquímica de OCT4 (nuclear e citoplasmática) NANOG (citoplasmática) *versus* a espessura de Breslow ( $\leq 2,0$  mm e  $> 2,1$  mm), considerado teste padrão-ouro para o diagnóstico do melanoma cutâneo. A intensidade de marcação foi classificada tendo como base os escores: 0 (ausência de expressão), 1 (fraca), 2 (intermediária) e 3 (forte). Foram calculados os índices de sensibilidade, especificidade e área sob a curva para os pontos de cortes para as variáveis.

## 5. RESULTADOS

Foram selecionados 102 casos de melanoma cutâneo diagnosticados em 2004 a 2008, no Setor de Anatomia Patológica, em uma unidade de referência para o tratamento de câncer em Goiânia-GO, onde foram submetidas à análise da expressão dos genes de *POU1F5/OCT4* e *NANOG*, por meio de imunohistoquímica.

A população do estudo constituiu-se de 62,7% (64/102) de indivíduos do sexo feminino e 37,3% (38/102) do sexo masculino. A média de idade observada nas mulheres foi de 57,2 anos (DP  $\pm$  17,3), já a média de idade nos homens foi de 63,1 anos (DP  $\pm$  17,0). A diferença da média das idades entre os grupos estudados foi estatisticamente significativa ( $p < 0,0026$ ). A faixa etária mais prevalente no diagnóstico variou entre 51 a 70 anos (44,1%). Contudo, houve uma paciente diagnosticada aos 13 anos de idade. Diferença significativa foi observada em relação à idade dos pacientes no momento do diagnóstico e o sexo ( $p < 0,023$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Distribuição dos casos de melanoma de acordo com o sexo e faixa etária dos pacientes na ocasião do diagnóstico.

SEXO	FEMININO	MASCULINO	TOTAL	<i>p</i>
n (%)	64 (62,7)	38 (37,3)	102 (100)	0,0026*
<b>Média de idade (<math>\pm</math>DP)</b>	57,2 ( $\pm$ 17,3)	63,1 ( $\pm$ 17,0)	59,4 ( $\pm$ 17,3)	
<b>Faixa etária no diagnóstico</b>	n (%)	n (%)	n (%)	
10-30	7 (10,9)	0 (0)	7 (6,9)	0,023*
31-50	17 (26,6)	5 (13,2)	22 (21,5)	
51-70	22 (34,4)	23 (60,5)	45 (44,1)	
71-90	17 (26,6)	10 (26,3)	27 (26,5)	
91-100	1 (1,5)	0 (0)	1 (1,0)	

\*A probabilidade de significância ( $p$ -valor) refere-se ao qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e exato de Fisher.

As características clínicas e histopatológicas dos pacientes com melanoma cutâneo foram descritas na Tabela 5. O sítio primário mais acometido pelo melanoma cutâneo foi o tronco que correspondeu a 32,3% (33/102) dos casos. Com

relação à história familiar de melanoma, 70,6% (72/102) dos pacientes relataram não existir casos na família; 10,8% (11/102) disseram que já houve casos de melanoma na família e em 18,6% (19/102) não havia informação disponível no prontuário. Sobre o tipo histológico, o extensivo superficial foi detectado em 52,9% (54/102) dos casos.

Segundo a espessura do tumor, que corresponde ao índice de Breslow, a maior incidência foi na classificação  $\leq 1,0\text{mm}$ , em 39,2% (40/102) dos casos; seguida pela lesão de profundidade  $> 4,0\text{mm}$ , em 23,5% (24/102). De acordo com o nível de Clark, 29,4% (30/102) corresponderam ao nível IV; seguidas pelo nível V em 25,5% (26/102). A ulceração estava presente em 45,1% (46/102) e ausente 54,9% (56/102) das amostras. Houve regressão em 11,8% (12/102) dos tumores e a regressão foi ausente em 82,2% (90/102). Sobre a infiltração linfocitária peritumoral estava presente em 91,2% (93/102) dos tumores. Em relação à presença de satélites microscópicos 87,3% (89/102) dos tumores avaliados não apresentaram essa característica. E ainda na avaliação histopatológica, 98% (100/102) dos casos apresentaram margens livres.

Metástases foram observadas em 47% (48/102) dos casos. Em relação à evolução clínica dos pacientes, 63,7% (65/102) estavam vivos ao final de cinco anos; 25,5% (26/102) foram a óbito por melanoma e 10,8% (11/102) foram a óbito por outras causas como, por exemplo, infarto agudo do miocárdio.

**Tabela 5:** Distribuição das variáveis clínicas e histopatológicas dos pacientes portadores de melanoma cutâneo no estudo.

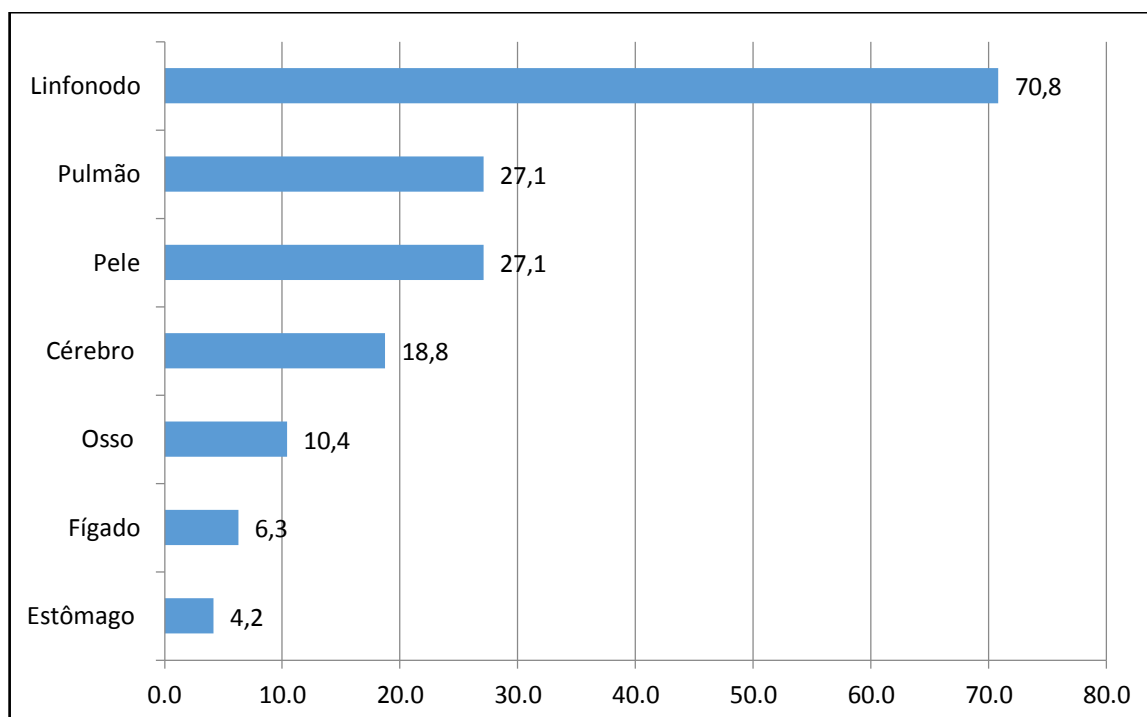
VARIÁVEIS	CATEGORIA	N	%
<b>Local primário</b>	Tronco	33	32,3
	Membros inferiores	25	24,5
	Face/ Couro cabeludo	19	18,6
	Membros superiores	14	13,8
	Palmoplantar	10	9,8
	Cervical	1	1,0
<b>História familiar de melanoma</b>	Sim	11	10,8
	Não	72	70,6
	Sem informação	19	18,6
<b>Tipo histológico</b>	Extensivo Superficial	54	52,9
	Nodular	26	25,5
	Acral	10	9,8
	Lentigo maligno	7	6,9
	Inclassificável	5	4,9
<b>Índice de Breslow</b>	In situ	1	1,0
	≤ 1,0 mm	40	39,2
	1,01 a 2,0 mm	22	21,6
	2,01 a 4,0 mm	15	14,7
	> 4,0 mm	24	23,5
<b>Nível de Clark</b>	I	1	1
	II	24	23,5
	III	21	20,6
	IV	30	29,4
	V	26	25,5
<b>Ulceração</b>	Presente	46	45,1
	Ausente	56	54,9
<b>Regressão</b>	Presente	12	11,8
	Ausente	90	82,2
<b>Infiltração Linfocitária Peritumoral</b>	Presente	93	91,2
	Ausente	9	8,8
<b>Satélite microscópico</b>	Presente	13	12,7
	Ausente	89	87,3
<b>Margens comprometidas</b>	Presente	2	2,0
	Ausente	100	98,0
<b>Metástases</b>	Presente	48	47
	Ausente	54	53
<b>Evolução</b>	Vivo	65	63,7
	Óbito por melanoma	26	25,5
	Outras causas de óbito	11	10,8

Dentre os casos analisados neste estudo, 47% (48/102) desenvolveram metástases à distância, dentro do período de cinco anos avaliados. Destas, 70,8%



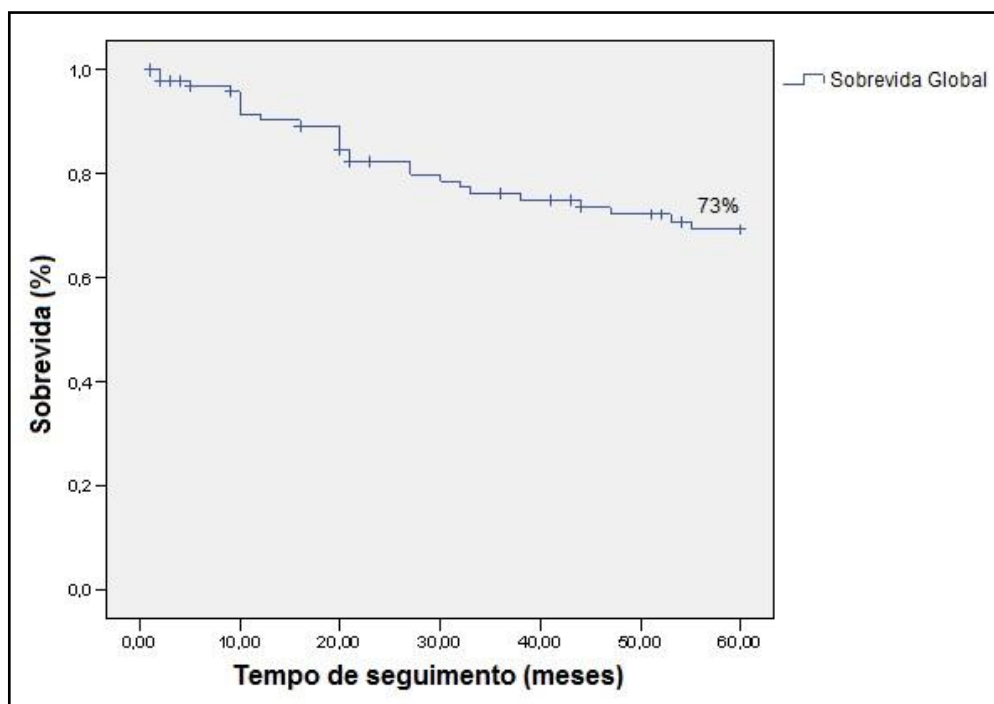
foram localizadas nos linfonodos, 27,1% nos pulmões e pele, 18,8% no cérebro, 10,4% nos ossos, 6,3% no fígado e 4,2% no estômago (Figura 19).

É importante ressaltar que os sítios de metástases, em alguns indivíduos, se repetiram duas ou três vezes em diferentes localizações como, por exemplo: linfonodo e pele; linfonodo, pulmão e cérebro.

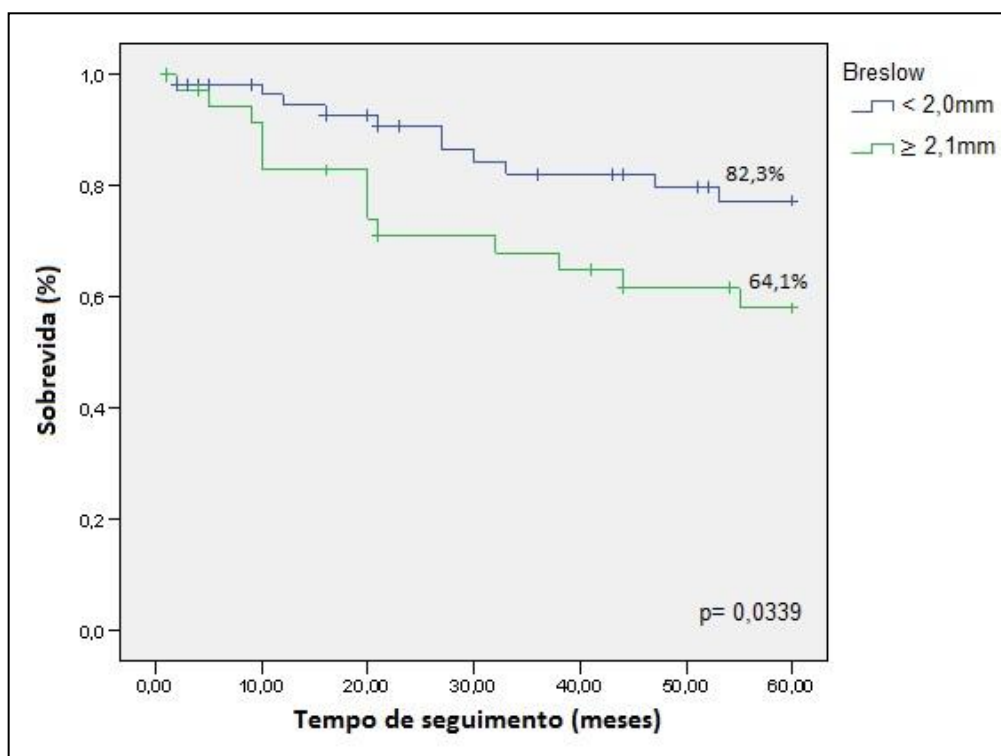


**Figura 19:** Distribuição dos principais sítios de metástases à distância entre os pacientes com melanoma cutâneo.

A sobrevida global, calculada no seguimento de cinco anos (60 meses), foi de 73% (Figura 20). A sobrevida para os pacientes com melanoma cutâneo com o índice de Breslow  $\leq 2\text{mm}$  foi de 82,3% e com o índice de profundidade  $\geq 2,1\text{mm}$  foi de 64,1%, demonstrando diferença significativa entre os grupos ( $p= 0,0339$ ) (Figura 21).

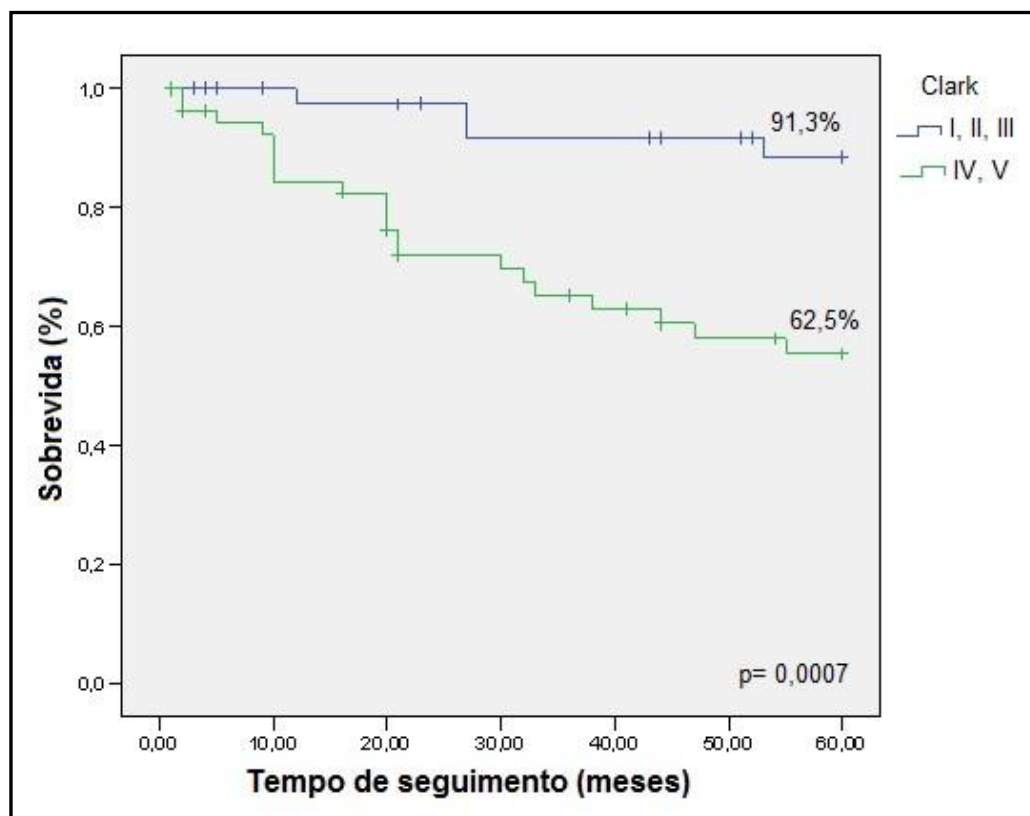


**Figura 20:** Curvas de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida global em cinco anos (60 meses) dos pacientes com melanoma cutâneo.



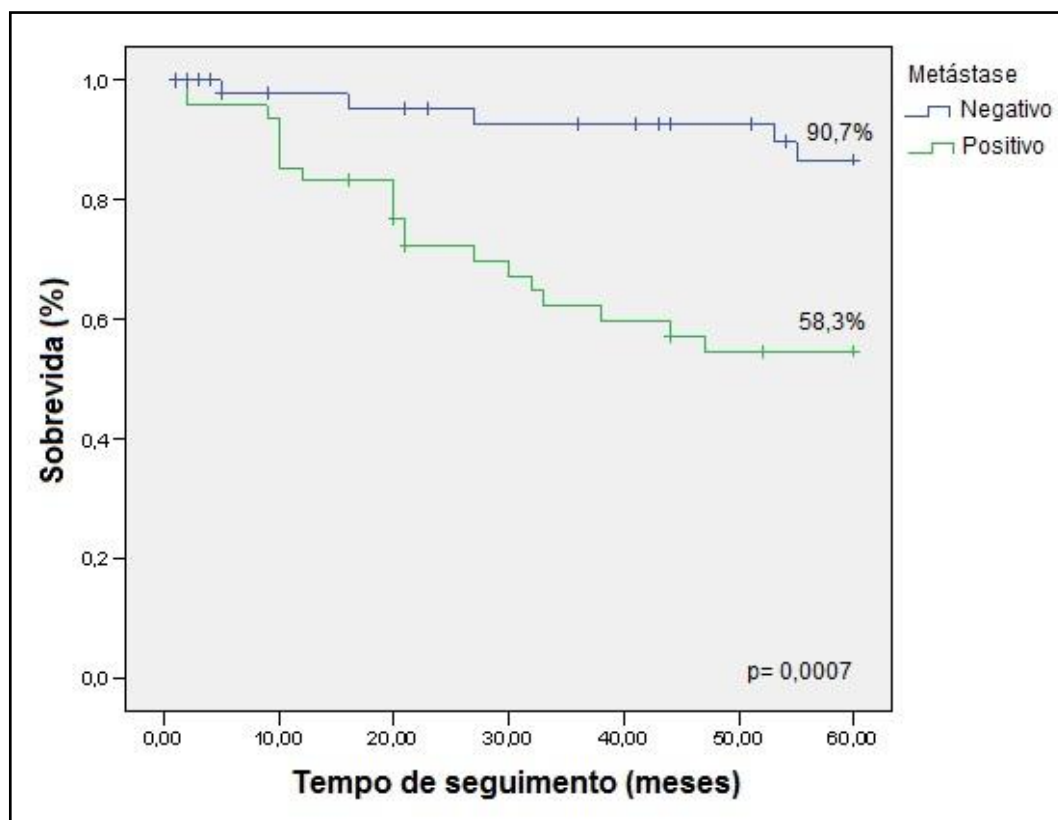
**Figura 21:** Curvas de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida em cinco anos (60 meses) comparando o índice de Breslow para os pacientes com melanoma cutâneo.

A sobrevida para os pacientes com melanoma cutâneo com os níveis de Clark I, II e III foi de 91,3% e com os níveis IV e V foi de 62,5%, evidenciando diferença significativa ( $p= 0,0007$ ) entre os dois grupos (Figura 22).



**Figura 22:** Curvas de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida em cinco anos (60 meses) comparando o nível de Clark para os pacientes com melanoma cutâneo.

A sobrevida para os pacientes com melanoma cutâneo metastático foi de 58,3% e para os indivíduos que não desenvolveram metástases foi de 90,7%, evidenciando diferença significativa entre os dois grupos ( $p= 0,0007$ ) (Figura 23).



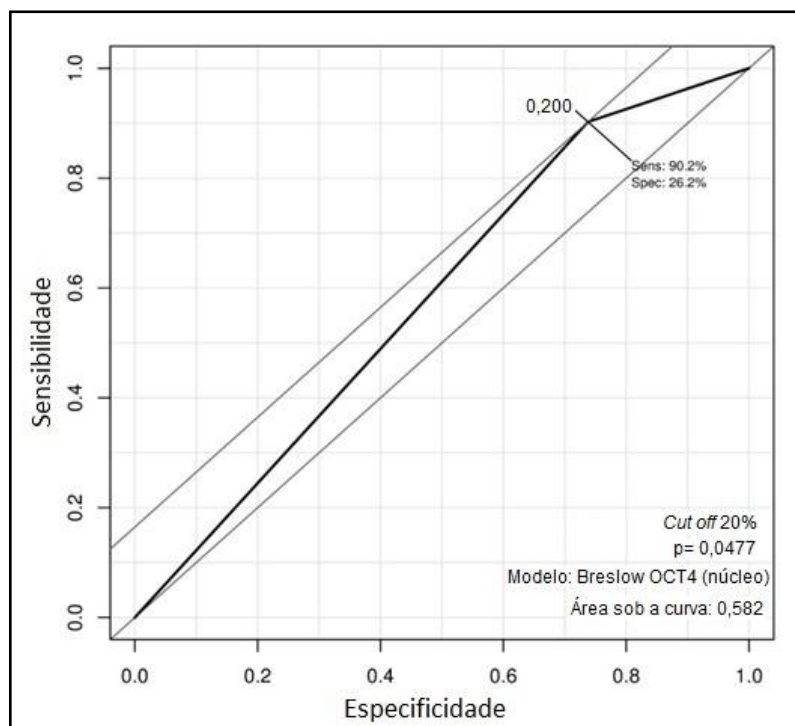
**Figura 23:** Curvas de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida global em cinco anos (60 meses) comparando com desenvolvimento de metástases para os pacientes com melanoma cutâneo.

A fim de se estabelecer um ponto de corte (*cut off*) para a expressão dos genes *POU1F5/OCT4* e *NANOG*, uma curva ROC foi calculada, utilizando-se o índice de Breslow, considerado o principal fator prognóstico para o melanoma cutâneo (teste padrão-ouro).

A curva ROC representa um método efetivo de avaliação da performance de um teste diagnóstico. É definida como a plotagem da sensibilidade do teste (eixo y) *versus* sua especificidade ou taxa de falsos positivos (eixo x). A medida combinada de sensibilidade e especificidade do teste é definida pela área sob a curva (AUC, do inglês: *Area Under the Curve*), que varia entre 0 e 1 (PARK; GOO; JO, 2004).

Os valores calculados para estabelecer o *cutoff* foram selecionados com base na marcação imunoistoquímica de OCT4 (nuclear e citoplasmática) NANOG (citoplasmática) *versus* a espessura de Breslow ( $\leq 2,0$  mm e  $> 2,1$  mm). A intensidade de marcação foi classificada tendo como base os escores: 0 (ausência de expressão), 1 (fraca), 2 (intermediária) e 3 (forte).

Para a proteína OCT4 (nuclear) foi calculado o *cut off* com valor de 20% para a marcação positiva, com área sob a curva de 0,582 ( $p= 0,0477$ ) (Figura 24).



**Figura 24:** Curva ROC comparando com o índice de Breslow para OCT4 nuclear.

A hiperexpressão de OCT4 (núcleo) foi observada em 50 casos (49%), enquanto a hipoexpressão foi observada em 52 casos (51%). Foi realizada uma análise univariada das possíveis associações entre a hipoexpressão ( $\leq 20\%$ ) e hiperexpressão ( $> 21\%$ ) de OCT4 (núcleo) e os aspectos patológicos em pacientes com melanoma cutâneo. A expressão de OCT4 (núcleo) foi comparada com as variáveis: índice de Breslow, nível de Clark, ulceração, metástases e óbito (Tabela 6).

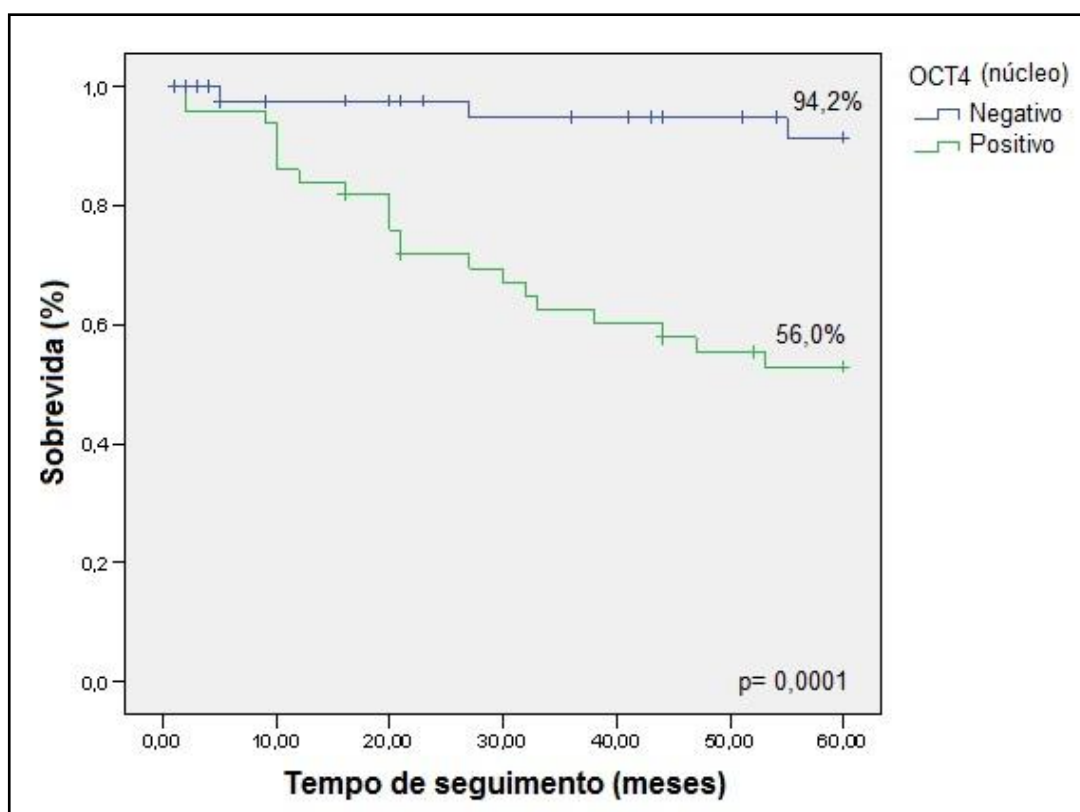
A análise univariada revelou associações significativas ( $p < 0,05$ ) entre a hiperexpressão nuclear de OCT4 e as seguintes variáveis: índice de Breslow com espessura de  $> 2,1$  mm ( $p = 0,021$ ; OR: 2,64; IC 95%: 1,15 - 6,05); níveis de Clark, IV e V ( $p = 0,001$ ; OR: 4,11; IC 95%: 1,79 - 9,46); ulceração presente ( $p \leq 0,0001$ ; OR: 459,0; IC 95%: 51,67 - 4077,27); presença de metástases ( $p \leq 0,0001$ ; OR: 40,25; IC 95%: 12,90 - 125,62) e óbito por melanoma cutâneo ( $p \leq 0,0001$ ). Todas as informações acima estão descritas na tabela 6.

**Tabela 6:** Análise univariada das possíveis associações entre a hipoexpressão ( $\leq 20\%$ ) e hiperexpressão ( $> 21\%$ ) de OCT4 (núcleo) e os aspectos patológicos em pacientes com melanoma cutâneo.

OCT4 (núcleo)	Negativo ≤ 20%		Positivo > 21%		p	Odds Ratio - OR Bruto	IC 95%
	n	%	n	%			
BRESLOW (mm)							
≤ 2,0	37	72,5	25	50	0,021	2,64	1,15 - 6,05
> 2,1	14	27,5	25	50			
CLARK							
I II III	32	61,5	14	28	0,001	4,11	1,79 - 9,46
IV V	20	38,5	36	72			
ULCERAÇÃO							
Não	51	98,1	5	10,0	≤ 0,0001	459,0	51,67 - 4077,27
Sim	1	1,9	45	90,0			
METÁSTASE							
Não	46	88,5	8	16,0	≤ 0,0001	40,25	12,90 - 125,62
Sim	6	11,5	42	84,0			
ÓBITO (MELANOMA)*							
Não	44	100	21	44,7	≤ 0,0001	-	-
Sim	0	0,0	26	55,3			
ÓBITO (OUTRAS CAUSAS)							
Não	44	84,6	21	87,5	0,740	1,27	0,31 - 5,29
Sim	8	15,4	3	12,5			

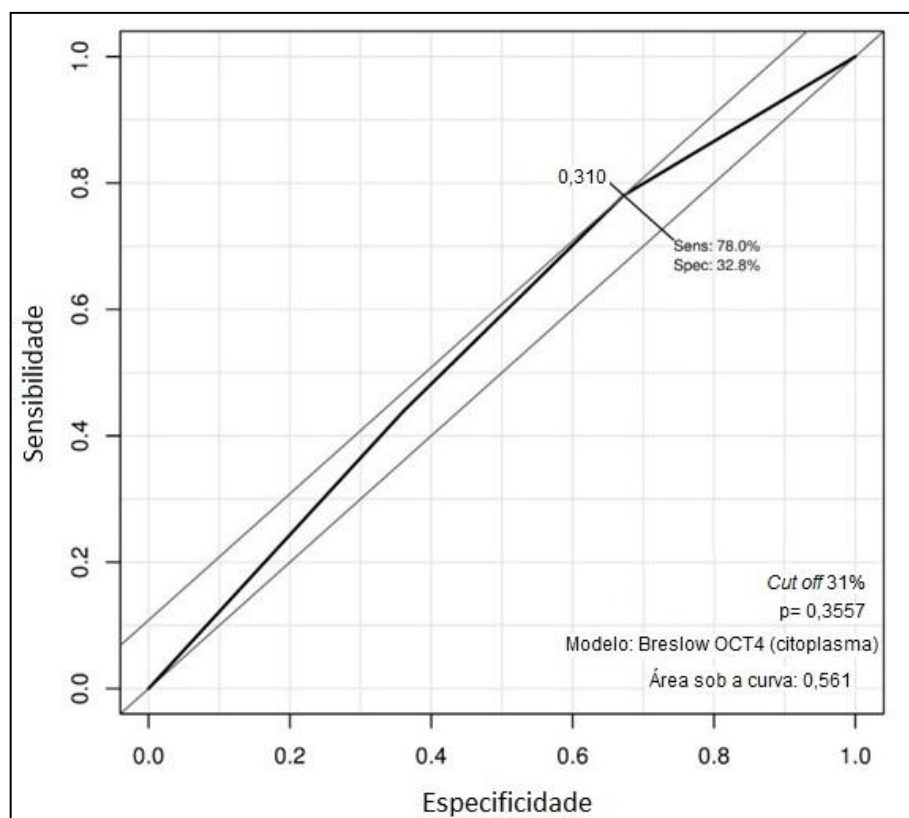
\* Teste: Exato de Fisher.

A sobrevida em 60 meses para os pacientes com melanoma cutâneo foi significativamente diferente em relação a marcação nuclear de OCT4 ( $p= 0,0001$ ). Pacientes com hipoexpressão de OCT4 nuclear apresentaram sobrevida de 94,2%, enquanto que aqueles com a hiperexpressão de OCT4 nuclear foi de 56% (Figura 25). Demonstrou-se, desta forma, que a expressão do OCT4 no núcleo está associada a uma menor sobrevida do indivíduo diagnosticado com melanoma cutâneo.



**Figura 25:** Curvas de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida em cinco anos (60 meses) comparando com a expressão de OCT4 (núcleo) para os pacientes com melanoma cutâneo.

O ponto de corte para a marcação citoplasmática de OCT4 foi de 31%, com a área sob a curva de 0,561 ( $p= 0,3557$ ), comparado com o índice de Breslow ( $\leq 2,0$  mm e  $> 2,1$  mm), considerado melhor fator prognóstico para o melanoma cutâneo (Figura 26).



**Figura 26:** Curva ROC comparando com o índice de Breslow para OCT4 citoplasmática.

A hiperexpressão de OCT4 citoplasmática foi observada em 42 casos (41,2%), enquanto a hipoexpressão foi observada em 60 casos (58,8%). Foi realizada uma análise univariada das possíveis associações entre a hipoexpressão ( $\leq 30\%$ ) e hiperexpressão ( $> 31\%$ ) de OCT4 (citoplasma) e os aspectos patológicos em pacientes com melanoma cutâneo. Foi comparada a expressão de OCT4 (núcleo) com as variáveis: índice de Breslow, nível de Clark, ulceração, metástases e óbito (Tabela 7).

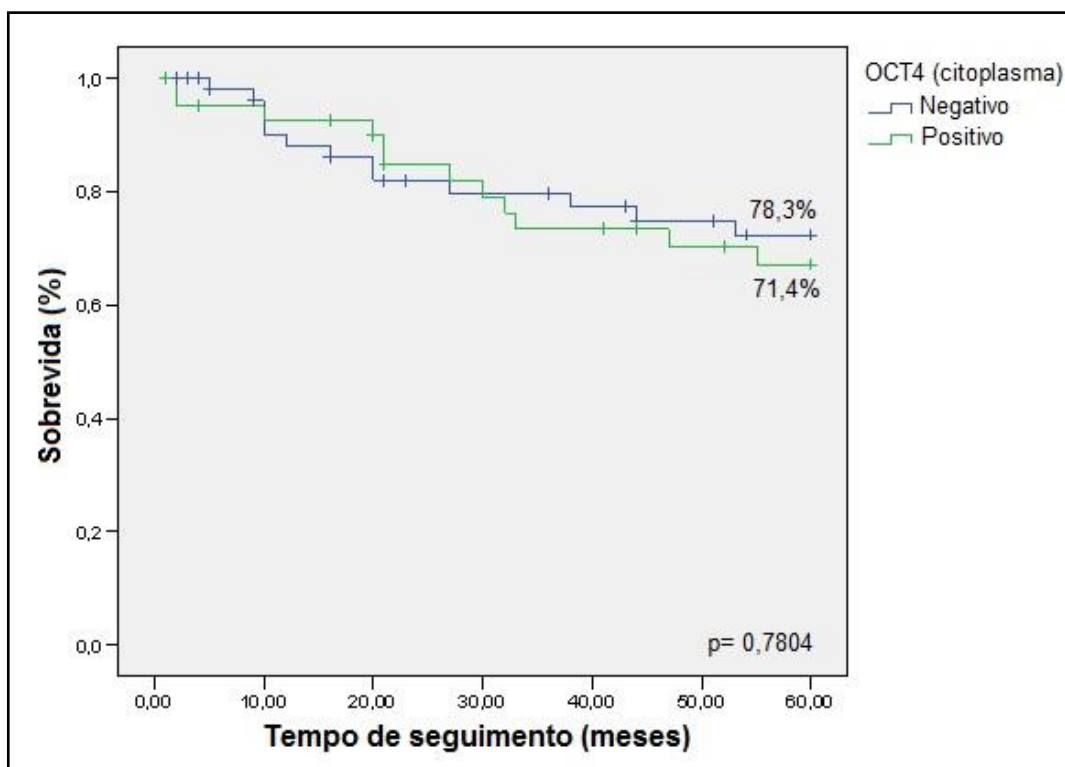
A análise univariada revelou associações significativas ( $p < 0,05$ ) entre a hiperexpressão citoplasmática de OCT4 e as seguintes variáveis: ulceração presente ( $p = 0,015$ ; OR: 2,73; IC 95%: 1,21 - 6,16); presença de metástases ( $p = 0,004$ ; OR: 3,34; IC 95%: 1,47 - 7,62) e óbito por melanoma cutâneo ( $p = 0,039$ ; OR: 2,67; IC 95%: 1,05 - 6,77). Todas as informações acima estão descritas na tabela 7.



**Tabela 7:** Análise univariada das possíveis associações entre a hipoexpressão ( $\leq 30\%$ ) e hiperexpressão ( $> 31\%$ ) de OCT4 (citoplasma) e os aspectos patológicos em pacientes com melanoma cutâneo.

OCT4 (citoplasma)	Negativo $\leq 30\%$		Positivo $> 31\%$		p	Odds Ratio - OR Bruto	IC 95%
	n	%	n	%			
<b>BRESLOW (mm)</b>							
$\leq 2,0$ mm	38	64,4	24	57,1	0,460	1,36	0,60 - 3,05
$> 2,1$ mm	21	35,6	18	42,9			
<b>CLARK</b>							
I II III	31	51,7	15	35,7	0,113	1,92	0,86 - 4,32
IV V	29	48,3	27	64,3			
<b>ULCERAÇÃO</b>							
Não	39	65,0	17	40,5	0,015	2,73	1,21 - 6,16
Sim	21	35,0	25	59,5			
<b>METÁSTASE</b>							
Não	39	65,0	15	35,7	0,004	3,34	1,47 - 7,62
Sim	21	35,0	27	64,3			
<b>ÓBITO (Melanoma)</b>							
Não	43	79,6	22	59,5	0,039	2,67	1,05 - 6,77
Sim	11	20,4	15	40,5			
<b>ÓBITO (Outras causas)</b>							
Não	43	87,8	22	81,5	0,460	1,63	0,45 - 5,94
Sim	6	12,2	5	18,5			

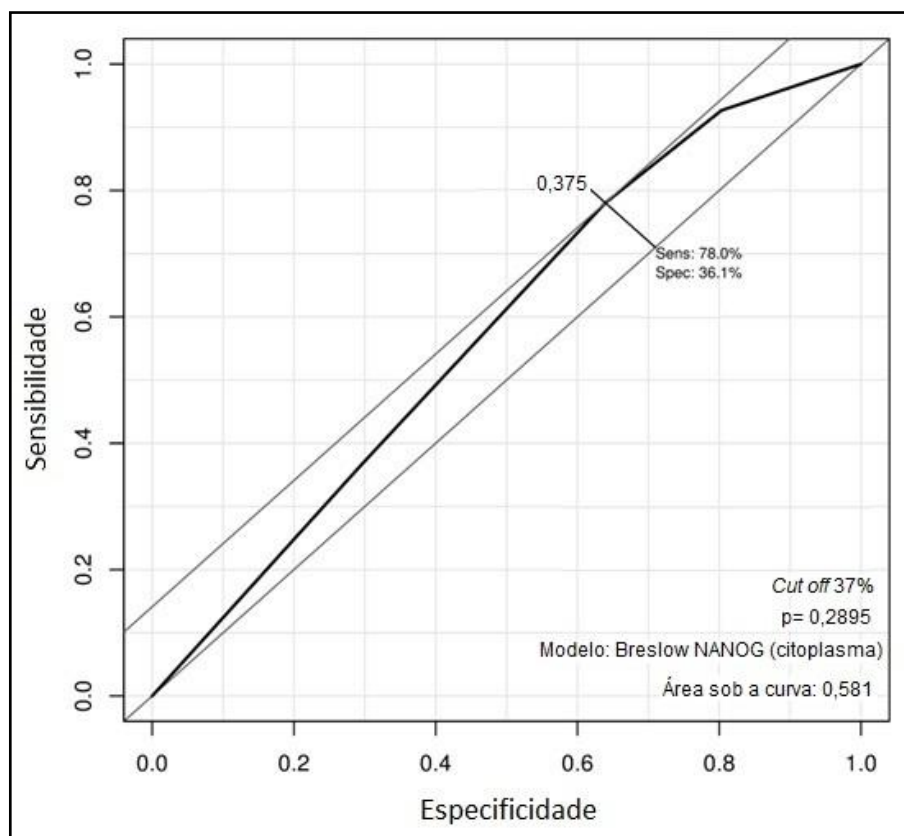
A sobrevida foi calculada pela curva de Kaplan-Meier, com seguimento de 60 meses, para os pacientes com melanoma cutâneo comparados com a hiperexpressão de OCT4 (citoplasma) foi de 71,4% e hipoexpressão em 78,3% e não foi demonstrada diferença significativa ( $p= 0,7804$ ) (Figura 27).



**Figura 27:** Curvas de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida em cinco anos (60 meses) comparando com a expressão de OCT4 (citoplasma) para os pacientes com melanoma cutâneo.

Não foi possível calcular a curva ROC para a marcação nuclear de NANOG, visto que, somente cinco pacientes apresentaram marcação de 30% das células neoplásicas. Desta forma, todas as análises foram realizadas apenas para marcação citoplasmática de NANOG.

O ponto de corte para NANOG (citoplasma) foi de 31% para a marcação positiva, com a área sob a curva de 0,581 ( $p= 0,2895$ ), comparado com o índice de Breslow ( $\leq 2,0$  mm e  $> 2,1$  mm), considerado melhor fator prognóstico para o melanoma cutâneo (Figura 28).



**Figura 28:** Curva ROC comparando com o índice de Breslow para NANOG citoplasmática.

A hiperexpressão de NANOG citoplasmática foi observada em 89 casos (82,25%), enquanto a hipoexpressão foi observada em 13 casos (12,74%). Foi realizada uma análise univariada das possíveis associações entre a hipoexpressão ( $\leq 37\%$ ) e hiperexpressão ( $>38\%$ ) de NANOG (citoplasma) e os aspectos patológicos em pacientes com melanoma cutâneo. Foi comparada a expressão de NANOG (citoplasma) com as variáveis: índice de Breslow, nível de Clark, ulceração, metástases e óbito (Tabela 8).

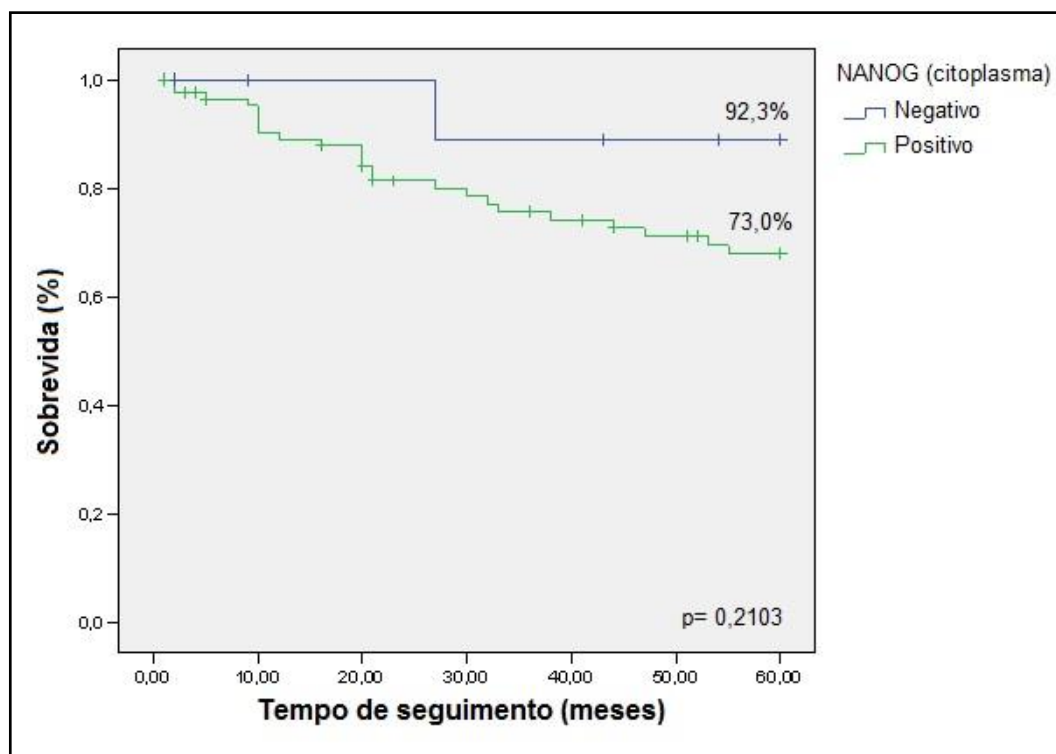
A análise univariada revelou associações significativas ( $p < 0,05$ ) entre a hiperexpressão citoplasmática de NANOG e as seguintes variáveis: ulceração presente ( $p \leq 0,0001$ ); presença de metástases ( $p \leq 0,0001$ ) e óbito por melanoma cutâneo ( $p = 0,030$ ). Todas as informações acima estão descritas na tabela 8.

**Tabela 8:** Análise univariada das possíveis associações entre a hipoexpressão ( $\leq 37\%$ ) e hiperexpressão ( $> 38\%$ ) de NANOG (citoplasma) e os aspectos patológicos em pacientes com melanoma cutâneo.

NANOG (citoplasma)	Negativo (≤37%)		Positivo (≤38%)		p	Odds Ratio - OR Bruto	IC 95%
	n	%	N	%			
BRESLOW (mm)							
≤ 2,0 mm	9	69,2	53	60,2	0,536	1,49	0,42 - 5,20
> 2,1 mm	4	30,8	35	39,8			
CLARK							
I II III	8	61,5	38	42,7	0,210	2,15	0,65 - 7,08
IV V	5	38,5	51	57,3			
ULCERAÇÃO*							
Não	13	100,0	43	48,3	≤ 0,0001	-	-
Sim	0	0,0	46	51,7			
METÁSTASE*							
Não	13	100,0	41	46,1	≤ 0,0001	-	-
Sim	0	0,0	48	53,9			
ÓBITO (Melanoma)*							
Não	11	100,0	54	67,5	0,030	-	-
Sim	0	0,0	26	32,5			
ÓBITO (Outras causas)							
Não	11	84,6	54	85,7	0,918	0,92	0,17- 4,84
Sim	2	15,4	9	14,3			

\* Teste: Exato de Fisher.

A sobrevida foi calculada pela curva de Kaplan-Meier, com seguimento de 60 meses, para os pacientes com melanoma cutâneo comparados com a hiperexpressão de NANOG (citoplasma) foi de 73,0% e hipoexpressão em 92,3% e não foi demonstrada diferença significativa ( $p= 0,2103$ ) (Figura 29).



**Figura 29:** Curvas de Kaplan-Meier ilustrando a sobrevida em cinco anos (60 meses) comparando com a expressão de NANOG (citoplasma) para os pacientes com melanoma cutâneo.

O melanoma cutâneo possui apresentação clínica agressiva e, frequentemente, mostra rápida velocidade de crescimento e disseminação metastática. Embora represente aproximadamente 4% dos tumores da pele, apresenta uma alta letalidade, sendo responsável por 60% de todas as mortes por neoplasias cutâneas (GIBLIN; THOMAS, 2007; KUPHAL; BOSSENHOFF, 2009). A chance de cura está condicionada ao diagnóstico precoce. Os conhecimentos da epidemiologia e patogênese do melanoma cutâneo fornecem subsídios para aplicação de medidas preventivas primárias e secundárias fundamentais para determinar estratégias de saúde pública (BALCH et al., 2009).

O entendimento de alterações moleculares mais recentemente associadas com o melanoma cutâneo poderá esclarecer melhor a gênese de sua malignidade, o diagnóstico e o prognóstico da doença, bem como o seu tratamento (SEKULIK et al., 2008). No sentido de colaborar com os avanços nesse entendimento é que foi desenvolvido e concluído este estudo, o qual enfatizou tanto os aspectos epidemiológicos, clínicos e histopatológicos do melanoma cutâneo primário, quanto a análise da expressão das proteínas OCT4 e NANOG em espécimes de melanoma cutâneo em 102 casos, diagnosticados entre 2004 a 2008.

Contudo, pouco ainda se sabe sobre o comportamento biológico e as alterações moleculares referentes a estes genes e a relação com o melanoma cutâneo. Diante desses fatos, este estudo é um dos muitos precursores que buscam respostas para o envolvimento de células tronco tumorais e o desenvolvimento da neoplasia.

Sabe-se que há genes marcadores de pluripotência associados às células tronco tumorais, como os que foram estudados nessas análises. Genes como o *POU5F1/OCT4* e *NANOG* podem ter um papel crítico na regulação das células tronco tumorais, em especial do melanoma cutâneo. No entanto, até o momento, não foram encontrados outros estudos que tenham realizado essas análises das proteínas OCT4 e NANOG em espécimes de melanoma cutâneo. Dessa forma, os dados encontrados foram observados e comparados a expressão dessas proteínas em outros tecidos já descritos na literatura.

Os resultados do presente estudo demonstraram uma predileção dos casos pelo sexo feminino (62,7%), dado condizente com a maioria dos trabalhos realizados no Brasil (BAKOS et al., 2002; FERRARI JÚNIOR et al., 2008; DIMATOS et al., 2009). Já outros autores, encontraram predomínio do sexo masculino (NASSER, 1993; CASTRO et al., 1996). Segundo Sortino-Rachou; Curado; Latorre (2006) descrevem que encontraram igualdade entre os sexos em um estudo de base populacional realizado em Goiânia, sobre melanoma cutâneo entre os anos de 1988 a 2000. O período de estudo diferente pode justificar essa mudança na incidência dessa neoplasia entre os sexos.

Entretanto, sabe-se que mulheres procuram atendimento médico mais frequentemente do que os homens, principalmente atendimento dermatológico. Esse fato pode ser uma possível explicação para o predomínio de mulheres no grupo amostral. Por ser o Brasil um país tropical, com temperaturas elevadas durante a maior parte do ano, principalmente em Goiânia, espera-se que haja maior exposição solar das pessoas durante a vida. Ainda assim, as mulheres utilizam roupas que permitem exposição maior da pele.

A idade ao diagnóstico do melanoma cutâneo possui relação com o prognóstico, sendo que, quanto maior a idade menor a sobrevida (BALCH et al., 2001). A média de idade observada no estudo foi de 57,2 anos para mulheres e 63,1 anos para homens. Dados que se assemelhou ao presente estudo de casuística nacional em relação à idade cujas amostras abrangiam pacientes adultos (NASSER, 1993; CRIADO, 1999; CARVALHO et al., 2004; BORGES et al., 2007). Segundo Sortino-Rachou; Curado; Latorre (2006), a média de idade ao diagnóstico observada no estudo em Goiânia foi de 54 anos, corroborando com o descrito na literatura.

Em estudos internacionais, as médias de idade foram semelhantes em relação aos achados nacionais. Buettner et al. (2005) num estudo que englobava pacientes da Alemanha, Áustria e Suíça, encontraram média de 54 anos. Segundo Lasithiotakis et al. (2006) compararam casos da Grécia com pacientes da Alemanha e registraram médias de 56 e 57 anos, respectivamente.

Apesar desses resultados classicamente conhecidos, ainda não se sabe o real motivo pelo qual o melanoma mostra uma tendência de aumento da taxa de diagnóstico na meia-idade. Supõe-se que ocorra aumento nas faixas etárias mais avançadas em virtude do efeito cumulativo da radiação solar, deterioração do

sistema imune, além dos danos ao material genético e sistema de reparo celular (DENNIS et al., 2008).

O local primário mais acometido pelo melanoma cutâneo foi o tronco (32,3%), seguido pelos membros inferiores (24,5%). Isso confirma a relação entre a ocorrência do melanoma cutâneo com a exposição à radiação solar, já que a maior incidência dessa neoplasia acontece em áreas mais expostas ao sol. Dados semelhantes foram observados em vários estudos (COHNCEDERMARK et al., 1997; ELWOOD et al., 1998; CRIADO et al., 1999; SCOGGINS et al., 2006).

Quanto à localização do tumor a maioria dos autores considera o tronco o local de pior prognóstico (MACKIE et al., 1992; DE VRIES et al., 2003; LINDHOLM et al., 2004; GARBE; EIGENTLER, 2007; DIMATOS et al., 2009). Segundo Chang; Karnell; Menck (1998) encontraram tumores localizados na cabeça e pescoço, somados ao tronco, configurando-se melanomas axiais como os de pior prognóstico. Assim, também Metelitsa et al. (2010) apuraram que as lesões na cabeça e pescoço possuíam pior prognóstico. Diferentemente, Nagore et al. (2006) mencionam pior sobrevida dos pacientes portadores de lesões localizadas em mãos e pés.

A história familiar de melanoma é um fator de risco importante. Pacientes com melanoma cutâneo em parentes de primeiro grau têm cerca de duas vezes mais risco (FORD et al., 1995), enquanto três ou mais familiares com melanoma podem aumentar o risco em 35 a 70 vezes (PAEK et al., 2008). Observou-se história de melanoma na família em 18,6% dos casos, semelhante ao descrito pela maioria dos estudos (CABRERA et al., 1994; JEN; MURPHY; GRANT-KELS, 2009; PRUTHI et al., 2009).

No que se refere ao tipo histológico do melanoma cutâneo mais encontrado foi o extensivo superficial em 52,9% dos casos; seguido pelo melanoma nodular com 25,5%. A literatura internacional cita que em indivíduos de cor branca predomina o melanoma extensivo superficial, variando de 37,7% no Chile a 43,6% na Argentina; 60% na Espanha; 62% na Suécia e 73,6% na Austrália (CABRERA et al., 1994; GARBE; MMLEOD; BUETTNER, 2000; LORIA; MATOS, 2001; LINDHOLM et al., 2004; NAGORE et al., 2006). Em um estudo da *National Cancer Data Base Report*, (CHANG; KARNELL; MENCK, 1998) com 84.836 registros de melanoma, o extensivo superficial foi o mais prevalente com 57,6%



casos, seguido pelo tipo nodular com 18,9%; 21,4% do tipo lentigo maligno e apenas 2,1% classificados como do tipo acral.

No entanto, alguns estudos mostram predomínio do tipo nodular sobre o extensivo superficial (GON; MINELLI; GUEMBAROVSKI, 2001; BORGES et al., 2007) fator atribuído, entre outros, as diferenças étnicas decorrentes da miscigenação no Brasil (BAKOS, 2002). Dessa forma, os resultados encontrados nesse estudo foram compatíveis com o descrito na literatura.

Em 1969 e 1970, Clarck e Breslow definiram a relação entre a espessura do tumor e a sobrevida do paciente. Atualmente, a espessura da lesão (índice de Breslow) é o melhor fator prognóstico para a sobrevida do paciente portador de melanoma (BRESLOW, 1970).

No que se refere ao índice de Breslow, a maior incidência foi na classificação  $\leq 1,0\text{mm}$  em 39,2% dos casos; seguida por lesões com profundidade  $>4,0\text{mm}$  (23,5%). A espessura de 1,01 a 2,0mm correspondeu a 21,6% dos casos; espessura de 2,01 a 4,0mm em 14,7% das lesões e apenas em 1,0% foram classificadas como *in situ*. Considerando a profundidade da invasão observou-se um grande número de tumores com espessura acima de 4,0mm. Uma provável explicação seria o fato de o Hospital Araújo Jorge ser referência em oncologia no Estado de Goiás. Desse modo, os casos mais graves e complexos são encaminhados para essa instituição.

Uma revisão de 1.254 casos de melanoma realizada na França (LIPSKER, 1999) mostrou que a espessura tumoral média foi de 1,48mm evidenciando um considerável aumento no diagnóstico do melanoma de pequena espessura. A incidência maior de melanomas dito finos (até 1,0mm de espessura), em contraste com a estabilização de melanomas espessos (maior que 3,5mm) foi evidenciada no estudo em questão. Além disso, dados provenientes de países desenvolvidos demonstram aumento na incidência de melanomas finos e estabilização da incidência de melanomas espessos (JEMAL et al., 2001; WEINSTOCK; MIKKILINEMI, 2001).

A explicação plausível para o aumento da incidência dos melanomas finos é a detecção mais precoce, em estádios iniciais, o que também justifica o aumento da incidência numa proporção maior que a mortalidade, bem como a melhora na sobrevida (LEITER et al., 2004; GARBE; EIGENTLER, 2007; HUI et al., 2007; PAEK et al., 2008).

Segundo Sortino-Rachou et al. (2006) encontraram, em uma amostra de 290 pacientes, apenas 2,8% com diagnóstico de melanoma *in situ*. Fernandes et al. (2005) numa casuística de 65 pacientes, também demonstraram índices menores de diagnóstico de melanoma *in situ* (2,5%), como o que foi evidenciado no presente estudo.

Na presente casuística de 102 casos, em relação ao nível de Clark 29,4% corresponderam ao nível IV; seguidas pelo nível V em 25,5%. O nível de Clark era considerado, inicialmente, um fator prognóstico independente, assim como o índice de Breslow. Já na versão de 2002 de estadiamento da AJCC, esse índice era computado para avaliação do prognóstico de lesões com o índice de Breslow de <1mm. Atualmente, o nível de Clark é considerado no estadiamento do melanoma fino ( $\leq 1$ mm) apenas quando as informações sobre o índice mitótico não podem ser avaliados (BALCH et al., 2009).

A ulceração é outra característica histológica associada à forte agressividade do melanoma (ZETTERSTEN et al., 2003). O percentual de ulceração estava presente em 40,2% das amostras analisadas. A sobrevida de pacientes com melanoma ulcerado é proporcionalmente pior em comparação àqueles sem ulceração (BALCH et al., 2009).

Na literatura internacional encontra-se cerca de 35% de melanoma ulcerado para pacientes com doença localizada e 6% de ulceração para melanoma finos (BALCH et al., 2001). O estadiamento, baseado na espessura de Breslow e na ulceração, foi a variável que mais influenciou a sobrevida, em 10 anos, em pacientes com melanoma localizado (FRANCKEN et al., 2004). No Brasil há relato de 43,6% de melanomas ulcerados sem distinção para finos ou espessos (VENEGAS et al., 1992).

Dentre os locais de metástases a distância analisados neste estudo 47% dos pacientes desenvolveram metástases, dentro do período de cinco anos de seguimento. Destas, 70,8% foram nos linfonodos. Cerca de dois terços das metástases iniciais irão se limitar a área de drenagem dos linfonodos regionais, fazendo destes o sítio mais comum, de melhor sobrevida do que as metástases a distância (WAGNER et al., 2000; BALCH et al., 2009). As metástases a distância podem ser de caráter não visceral acometendo pele, tecido subcutâneo e linfonodo não regional; assim como visceral afetando mais frequentemente o pulmão (18-36%), seguido pelo fígado (14-20%), cérebro (12-20%), osso (11-

17%) e trato gastrointestinal (1-7%). As metástases não viscerais usualmente apresentam melhor prognóstico quando comparadas as viscerais (WAGNER et al., 2000; PAEK et al., 2008).

O melanoma metastático de sítio primário desconhecido representa 2% a 5% do melanoma, e em 60% dos casos há o acometimento dos linfonodos. Outros locais afetados são a pele e o tecido subcutâneo, sendo menos frequente o envolvimento do pulmão, cérebro e trato gastrointestinal (PAEK et al., 2008).

Em relação à evolução clínica dos pacientes no estudo 25,5% foram a óbito por melanoma, de acordo com o atestado de óbito. Segundo vários estudos houve uma melhora na sobrevida do melanoma cutâneo nos últimos anos, o que é atribuído ao diagnóstico precoce (HALL et al., 1999; JEMAL et al., 2001; BUETTNER et al., 2005; LIANG; ROBINSON; MARTIN, 2010). Nos Estados Unidos, entre os anos de 2002 a 2006, as taxas de mortalidade diminuíram em homens e mulheres com menos de 65 anos, mas aumentou para os indivíduos mais velhos com melanoma cutâneo (6,6% para homens e 0,6% para mulheres) (JEMAL, 2011; POLLACK, 2011).

A curva de sobrevida global calculada no estudo, com seguimento de 5 anos, foi de 73%. Resultado igual foi constatado por Criado et al. (1999) que acompanharam por cinco anos 131 pacientes e obtiveram índice de sobrevida de 73%. Sortino-Rachou; Curado; Latorre (2006) encontraram sobrevida média de 81,4% em um período de 12 anos de observação. Os pacientes avaliados nesse estudo foram observados desde o momento do diagnóstico, confirmado por laudo histopatológico, até o momento em que saíram do estudo, ou por óbito ou por último contato ambulatorial.

Na Austrália, observou-se uma tendência de queda nas taxas de mortalidade do melanoma entre o final dos anos 1980 até 2002, para homens e mulheres com idades entre 35 a 54 anos (2,4% e 2,9%; respectivamente), enquanto as taxas permaneceram estáveis aquelas com idade entre 55 a 79 anos (BAADE; COORY, 2005).

A mortalidade foi crescente no presente estudo, com o aumento da profundidade de Breslow, invasão de Clark e a presença de metástases. A análise estatística mostrou-se significativa ao comparar a mortalidade por melanoma entre os diferentes níveis de Breslow ( $p= 0,0339$ ), Clark ( $p= 0,0007$ ) e metástases ( $p= 0,0007$ ) revelando-se uma maior gravidade entre os pacientes.

A sobrevida para os pacientes com melanoma cutâneo comparados com o índice de Breslow  $\leq 2\text{mm}$  foi de 82,3% e o índice de profundidade de  $\geq 2,1\text{mm}$  foi de 64,1% ( $p= 0,0339$ ). Resultados semelhantes foram observados por Garber et al. (2011) ao relatarem que o risco de morrer por melanoma é linearmente crescente com o aumento da espessura do tumor, até uma profundidade de 6mm, a partir de quando o risco atinge um platô.

Lapa et al. (2002) encontraram 100% dos pacientes com melanomas finos livres da doença em oito anos, valor que caiu para 36,4% nos pacientes quando a profundidade ultrapassava 3,5mm. Lashitiotakis et al. (2006) encontraram aumento da proporção de tumores diagnosticados com espessura inferior a 1mm entre os períodos de 1976-1989 e 1990-2003; em paralelo, a mortalidade decresceu 2% ao ano entre homens e 4,9% ao ano entre mulheres.

No presente estudo o aumento do nível de Clark apresentou relação direta com o risco de óbito e com menor sobrevida, os níveis de Clark I, II e III foi de 91,3% e os níveis IV e V foram de 62,5% evidenciando diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,0007$ ).

Resultado semelhante foi constatado por Marghoob et al. (2000) crescentes níveis de Clark influenciaram a ocorrência de óbitos por melanoma nos pacientes com tumor localizado, de forma independente da idade, localização, ulceração e espessura do tumor. Foram estudados 919 pacientes e aqueles com melanoma nível V de Clark apresentaram risco 14 vezes maior de morte em 10 anos do que aqueles com melanoma nível I ( $p<0,0001$ ). Chang et al. (2004) também relataram redução da sobrevida, em cinco anos, para pacientes com melanoma nível de Clark IV e V. Um estudo prospectivo conduzido na Suécia entre 1990 e 1999, que incluiu 12.533 pacientes, mostrou a associação entre nível de Clark e a redução do tempo livre de doença e da sobrevida específica (LINDHOLM et al., 2004). De acordo com Scoggins et al. (2010) o nível de Clark IV e V foi associado a maior risco de ocorrência de metástase no linfonodo sentinela, em pacientes com melanomas espessos ( $>4\text{mm}$ ), corroborando com o descrito no presente trabalho.

No entanto, outros autores não comprovaram a influência do nível de Clark na evolução da doença, independente de outros parâmetros clínicos e histológicos. Mays et al. (2010) mostraram que, em melanomas com espessura entre 1 e 2mm, o nível de Clark não influenciou a ocorrência de metástase

linfonodal, a distância e a sobrevida dos pacientes. Em um estudo de coorte prospectivo, que incluiu 38 pacientes com melanoma cutâneo primário e satelitose microscópica, a variável em questão também não afetou a ocorrência de metástases (KIMSEY et al., 2009). No estudo conduzido por Thorn *et al.* (1994) de base populacional na Suécia com amostra randomizada de 498 pacientes, mostrou na análise multivariada que a metástase regional e a espessura do tumor permaneceram como fator prognóstico independente. Entretanto, nesse mesmo estudo, não foi observada associação significativa entre o tipo histológico ou o nível de invasão de Clark.

Foi verificada também a sobrevida dos indivíduos comparando com o desenvolvimento de metástases (58,3%); e indivíduos que não desenvolveram metástases (90,7%) evidenciando diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0007$ ). As metástases denotam pior prognóstico, com estimativas de sobrevida avaliadas em meses. Estudos evidenciam uma menor sobrevida em indivíduos com melanoma metastático (WAGNER et al., 2000; PAEK et al., 2008; BALCH et al., 2009; MORENO; BATISTA; BONETTI, 2012) corroborando com o descrito no presente trabalho.

Deste modo, essas observações epidemiológicas e clínico-patológicas foram bastante compatíveis com relatos da literatura sobre melanoma cutâneo. Para a quantificação da expressão das proteínas OCT4 e NANOG em melanoma primário, utilizamos a técnica de imunohistoquímica nos pacientes com melanoma cutâneo estudo este pioneiro.

A hiperexpressão nuclear de OCT4 revelou associações significativas com as seguintes variáveis: índice de Breslow com espessura de  $> 2,1$  mm; níveis de Clark, IV e V; ulceração presente; presença de metástases e óbito por melanoma cutâneo. A sobrevida para os pacientes com melanoma cutâneo comparados com a hiperexpressão de OCT4 (nuclear) foi de 56% e hipoexpressão em 94,2% demonstrando diferença significativa ( $p=0,0001$ ). Demonstrou-se, desta forma, que a expressão do OCT4 no núcleo está associada a uma menor sobrevida do indivíduo diagnosticado com melanoma cutâneo.

Já a hiperexpressão citoplasmática de OCT4 mostrou-se associadas com as seguintes variáveis: ulceração presente; presença de metástases e óbito por melanoma cutâneo.

A expressão de OCT4 também tem sido implicada com um marcador de células-tronco tumorais (ATLASI et al., 2007; KIM; NAM, 2011). A superexpressão de OCT4 foi detectada em tumores de próstata, nas células-tronco tumorais da mama, nas células-tronco tumorais do cérebro e em células de iniciação tumoral em modelos de ratos (BEN-PORATH et al., 2008; DARINI et al., 2012; TSAI et al., 2014).

Pesquisas recentes relataram que OCT4 é utilizado para a identificação precoce de células-tronco tumorais em vários tipos de câncer, incluindo ovário, pulmão, câncer de bexiga, mama, colo do útero, bem como câncer de cabeça e pescoço, sendo associado com a progressão tumoral e risco de metástases (THOMAS; CHENG, 2005; KAROUBI et al., 2009; HATEFI et al., 2012; KRISHNAMURTHY; NOR, 2012; WANG et al., 2013; HASSIOTOU et al., 2013; TSAI et al., 2014; RAVINDRAN et al., 2015; CAI et al., 2016) como evidenciado no estudo com melanoma cutâneo podendo ser considerado como um potencial marcador de prognóstico do tumor.

A hiperexpressão citoplasmática de NANOG revelou associações significativas com as seguintes variáveis: ulceração presente; presença de metástase e óbito por melanoma cutâneo.

Segundo Xie e colaboradores (2013), relatou que a proteína homeodomínio NANOG que atua com OCT4 e SOX2 encontrou-se sua expressão aumentada em alguns tecidos com células cancerosas, relatando também, a utilização como biomarcador de prognóstico em carcinomas colorretais e adenocarcinoma de pulmão. A expressão da proteína OCT4 e NANOG também mostrou-se associada com mau prognóstico e risco de metástase em alguns tipos de câncer como: pulmão, pâncreas, mama, cérebro e fígado (CHIOU et al., 2010; GUO et al., 2011; LING et al., 2012; LU et al., 2013; WANG et al., 2014; YIN et al., 2015).

Segundo Borrull e colaboradores (2012), a hiperexpressão de OCT4 e NANOG em células de melanoma aumenta a capacidade destas células a transmigração através do ganho da motilidade amebóides, levando a uma maior capacidade de invasão e agressividade.

Estudos recentes têm revelado que o tema acerca das células-tronco tumorais é importante, uma vez que estas células desempenham um papel decisivo na formação e crescimento de tumores. A recorrência do tumor e a sua resistência às drogas pode ser atribuída as células-tronco tumorais

potencialmente quiescentes, que permanecem vitais e capazes de repovoamento sob terapias contra o câncer (ZHANG et al., 2012; SINHA et al., 2013; TSAI et al., 2014; HABU et al., 2015).

Portanto, a identificação de um marcador específico que defina o fenótipo das células-tronco tumorais é desejável, de modo que a relevância clínica da expressão do marcador em cada tipo de tumor possa ser avaliada, o que é essencial para o estabelecimento de alvos terapêuticos eficazes.

A partir dos resultados desta pesquisa, na qual foi evidenciada elevada expressão de OCT4 e NANOG no melanoma, este fato pode sugerir que estas proteínas desempenham papel importante na identificação de células-tronco tumorais, permitindo uma previsão do comportamento biológico desta neoplasia. Acreditamos que esse achado seja fundamental no planejamento de novos estudos. Certamente foi ultrapassado mais um obstáculo na direção do conhecimento da patogênese, foi estudado a importância de fatores que podem auxiliar na predição do prognóstico dos pacientes com essa neoplasia e é mais uma contribuição científica para que conheçamos, um dia quem sabe, o tratamento definitivo e eficaz para os pacientes com melanoma metastático. Um enfoque mais aprofundado neste tema é de grande importância para decifrarmos as complexidades do melanoma cutâneo.

Assim sendo, parece-nos que estes resultados recentes, embora ainda necessitando de confirmação através de estudos adicionais, sugerem uma perspectiva bastante favorável em direção a um histórico salto de qualidade no que diz respeito ao melhor conhecimento e avaliação prognóstica do melanoma cutâneo. Mais do que nunca, portanto, é necessário que este seja um tema considerado de grande relevância entre aqueles que se dedicam ao tratamento do melanoma, a fim de que possamos, em um menor prazo possível, transformar estes avanços na área da pesquisa em biologia molecular em verdadeiros benefícios no tratamento de nossos pacientes. Acredita-se que o melhor conhecimento das células-tronco tumorais bem como a expressão de OCT4 e NANOG irá influenciar na decisão terapêutica e na modalidade de tratamento, o que por fim, terá influência direta no prognóstico do melanoma cutâneo.

Embora este estudo tenha demonstrado uma associação forte entre fatores prognósticos e expressão de OCT4 e NANOG, é sugerida a realização de estudos

com um grupo amostral maior, em vários tipos tumores para evidenciar a importância das células-tronco tumorais na progressão dos tumores.

Diante dos achados do presente estudo, sugere-se que além de novas investigações empregando-se OCT4 e NANOG, evidencia-se ainda a necessidade de continuidade na investigação com outras proteínas, bem como com outros métodos utilizados para detectar e isolar células-tronco tumorais, já que uma combinação de marcadores e métodos seria mais confiável e mais específica para identificar células tronco-tumorais envolvidas no desenvolvimento e progressão tumoral, e assim, melhor compreender o comportamento biológico desta neoplasia.



### → Dados epidemiológicos e clínico-patológicos

- A maior parte do grupo de estudo constitui-se de indivíduos do sexo feminino.
- A faixa etária no momento do diagnóstico do melanoma cutâneo variou entre 51 a 70 anos.
- O local primário mais acometido pelo melanoma cutâneo foi o tronco.
- O tipo histológico mais encontrado foi o extensivo superficial.
- O índice de Breslow foi mais incidente na classificação  $\leq 1,0\text{mm}$ .
- O nível de Clark IV foi mais prevalente.
- A ulceração do tumor foi observada em 45,1% dos casos.
- Metástases foram observadas em 47% dos casos, sendo o principal sítio de metástases à distância nos linfonodos.
- Sobre a ocorrência de óbitos 25,5% dos casos foram a óbito por melanoma.
- A sobrevida para os pacientes com melanoma cutâneo foi de 73,0%.
- Os fatores prognósticos significativamente associados à sobrevida dos pacientes com melanoma cutâneo foram: índice de Breslow, níveis de Clark e metástases.

### → OCT4 (núcleo)

- A hiperexpressão nuclear de OCT4 foi observada em 49% dos casos e estiveram significativamente associadas com: Breslow, Clark, ulceração, metástases e óbito por melanoma.
- Pacientes com hiperexpressão de OCT4 nuclear apresentaram sobrevida significativamente menor (56,0%) comparados os que apresentaram hipoexpressão de OCT4 (94,2%) ( $p= 0,0001$ ).

#### → OCT4 (citoplasma)

- A hiperexpressão citoplasmática de OCT4 foi observada em 41,2% dos casos e estiveram significativamente associadas com: ulceração, metástases e óbito por melanoma.

#### → NANOG (citoplasma)

- A hiperexpressão de NANOG citoplasmática foi observada em 82,25% dos casos e estiveram significativamente associadas com: ulceração, metástases e óbito por melanoma.

- ABBASI N.R.; YANCOVITZ, M.; GUTKOWICZ-KRUSIN, D., et al. Utility of lesion diameter in the clinical diagnosis of cutaneous melanoma. *Archives of Dermatology*, v, 144, n. 4, p. 469-474, 2008.
- ALBERIO, R.; CAMPBELL, K.H.; JOHNSON, A.D. Reprogramming somatic cells into stem cells. *Reproduction*, v. 132, n. 5, p. 709-720, 2006.
- AL-HAJJ, M.; WICHA, M. S.; BENITO-HERNANDEZ, A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 7, p. 3983-3988, 2003.
- ALLOUBA, M. H.; ELGUINDY, A. M.; KRISHNAMOORTHY, N., et al. NANOG: A pluripotency homeobox (master) molecule. *Global Cardiology Science and Practice*, v. 36, p. 1-9, 2015.
- ALMEIDA F.A.; ALMEIDA G.O.O. Melanoma Cutâneo. In: Ramos e Silva M, Castro MCR, editors. *Fundamentos de Dermatologia*. 1. ed. Ed. Atheneu, Rio de Janeiro. p. 1737-1743, 2009.
- ALONSO, S.R.; OTIZ, P.; POLLÁN, M., et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: A tissue microarray-based study. *American Journal of Pathology*, v. 164, n. 1, p.193-203, 2004.
- ATLASI, Y.; MOWLA, S.J.; ZIAEE, S.A., et al. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *International Journal of Cancer*, v. 120, n. 7, p. 1598–1602, 2007.
- BAADE, P.; COORY, M. Trends in melanoma mortality in Australia: 1950-2002 and their implications for melanoma control. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*; v. 29, n. 4, p. 383-386, 2005.
- BACCELLI I, I.; TRUMPP, A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *The Journal of Cell Biology*, v. 198, n. 3, p. 281-293, 2012.
- BAKOS, L.; WAGNER, M.; BAKOS, R., et al. Sunburn, sunscreen, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. *International Journal of Dermatology*, v. 41, n. 9, p. 557-562, 2002.
- BAKOS, R.M.; BAKOS, L.; EDELWEISS M.I.A., et al. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in melanocytic nevi is altered by ultraviolet B. *Photodermatology, Photoimmunology Photomedicine*, v. 23, n.6. p. 250–254, 2007.
- BALCH, C.M.; GERSHENWALD, J.E.; SOONG, S.J., et al. "Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of Clinical Oncology*, v. 27, n. 36, p. 6199-6206, 2009.

BALCH, C.M.; SOONG, S.J.; GERSHENWALD, J.E., et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *Journal of Clinical Oncology*, v. 19, n. 16, p. 3622-3634, 2001.

BARNHILL, R.L. *Pathology of Malignant Melanoma*. 1. ed. New York: Springer; 2004.

BATAILLE, V. Genetic epidemiology of melanoma. *European Journal of Cancer*, New York, v. 39, n. 10, p. 1341-1347, 2003.

BELFORT, F. A.; ALMEIDA, F. A. *História do Melanoma e o Grupo Brasileiro de Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento*. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 3-10, 2014.

BEN-PORATH, I.; THOMSON, M.W.; CAREY, V.J., et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genetics*, v. 40, n. 5, p. 499-507, 2008.

BERWICK M.; WIGGINS C. The current epidemiology of cutaneous malignant melanoma. *Frontiers in Bioscience*, v. 1, n. 11, p. 1244-1254, 2006.

BETTI, R.; MARTINO, P.; VERGANI, R., et al. Nodular melanomas: analysis of the casistic and relationship with thick melanomas and diagnostic delay. *Journal Dermatology*, v. 35, n.10, p. 643-650, 2008.

BHAJEE, F.; PEPPER, D.J.; PITMAN K.T., et al. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: a review of current knowledge and future applications. *Head Neck*, v.34, n.6, p.894-9, 2012.

BICHAKJIAN, C.K.; HALPERN, A.C.; JOHNSON, T.M. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. *Journal American Academy of Dermatology*, v. 65, n. 5, p. 1032-1047, 2011.

BISHOP, D.T.; DEMENAS, F.; ILES, M.M., et al. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nature Genetics*, v. 41, n. 8, p. 920-925, 2009.

BISSELL, M. J.; RADISKY, D. Putting tumours in context. *Nature Reviews Cancer*, v. 1, n. 1, p. 46-54, 2001.

BITTENCOURT, F.V. *Caracterização da Lesão Primária*. Wainstein AJA, Belfort FA, editors. In: *Melanoma: Prevenção, Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento*. 2. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, p. 75-81, 2014.

BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, v. 3, n. 7, p. 730-737, 1997.

BORGES, S.Z.; BAKOS, L.; CARTELL, A., et al. Distribution of clinicalpathological types of cutaneous melanomas and mortality rate in the region of Passo Fundo, RS, Brazil. *International Journal of Dermatology*, v. 46, n. 7, p. 679–686, 2007.

BORRULL, A.; GHISLIN, S.; DESHAYES, F., et al. Nanog and Oct4 Overexpression Increases Motility and Transmigration of Melanoma Cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 138, n. 7, p. 1145-1154, 2012.

BRESLOW A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma, *Annals of Surgery*, v. 172, n. 5, p. 902-908, 1970.

BUETTNER, P.G.; LEITER, U.; EIGENTLER, T.K.; et al. Development of prognostic factors and survival in cutaneous melanoma over 25 Years. An analysis of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *Cancer*, v. 103. p. 616-624. 2005.

CABRERA, R.; SILVA, S.; DÍAS DE MEDINA, J., et al. Clinical study of 113 cases of malignant melanoma. *Revista Médica do Chile*, v. 122, n. 8. p. 900-906, 1994.

CAI S.; GENG S.; JIN F., et al. POU5F1/Oct-4 expression in breast cancer tissue is significantly associated with non-sentinel lymph node metastasis. *BMC Cancer*, v. 1, n. 16, p. 1-8, 2016.

CAMPBELL LL.; POLYAK K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution. *Cell Cycle*, v. 6, n. 19, p. 2332-2338, 2007.

CAMPOS, P. M. Avaliação da atividade inibitória de melanogênese do extrato hidroalcoólico da *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zapp. 106f, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CARVALHO, C.A.; CUNHA, M.E.; GIUGLIANI, R.; et al. Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no sul do Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.79, p. 53-60, 2004.

CASTANET J.; ORTONNE J.P. Pigmentary changes in aged and photoaged skin. *Archives of Dermatology*, v. 133, n. 10, p. 1296-1299, 1997.

CASTRO, L.G.M.; TOYAMA, CL, GOMES AP, FREIRE MA, BRITO TF. Câncer de pele em clínica particular em São Paulo-SP. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 71, p. 471-476, 1996.

CAUFFMAN, G.; VAN DE VELDE H.; LIEBAERS, I., et al. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Molecular Human Reproduction*, v. 11, n. 3, p. 173-181, 2005.

CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M., et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, v. 113, n. 5, p. 643-655, 2003.

CHANG, A.E.; KARNELL, L.H.; MENCK, H.R. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: summary of 84.836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer*, v. 83, n. 8, p. 1664-1678, 1998.

CHANG, C.C.; SHIEH, G.S.; WU P., et al. Oct-3/4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells. *Cancer Research*, v. 68, n. 15, p. 6281-6291, 2008.

CHANG, J.W.; YEH, K.Y.; WANG, C.H., et al. Malignant melanoma in Taiwan: a prognostic study of 181 cases. *Melanoma Research*, v. 14, n. 6, p. 537-541, 2004.

CHEN, C.; MENG, F.; WAN, H., et al. Interaction between microRNAs and OCT4. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, v. 18, n. 1, p. 55-8, 2015.

CHIOU, S.H.; WANG, M.L.; CHOU, Y.T., et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Research*, v. 70, n. 24, p. 10433-10444, 2010.

CHUDNOVSKY Y.; KHAVARI P. A.; ADAMS A.E. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *Journal of Clinical Investigation*, v. 115, n. 4, p. 813-824, 2005.

CHUONG C.M.; NICKOLOFF, B.J.; ELIAS, P.M., et al. What is the 'true' function of skin? *Experimental Dermatology*, v. 11, n. 2, p. 159-187, 2002.

CID-10: Classificação Internacional de Doenças - Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde: CID-10 Décima revisão. Trad. do Centro Colaborador da OMS para a Classificação de Doenças em Português. 3 ed. São Paulo: EDUSP; 1996.

CLARK, W.H Jr.; FROM, L.; BERNARDINO, E.A. et al. The histogenesis and biological behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Research*, v. 29, n. 3, p. 705-727, 1969.

CLÍNICA PRIETO LUNA - Cirurgia Plástica e Bem-estar Site da internet. 2010. Disponível em: <<http://www.clinicaprietoluna.com.br/cirurgias/cancer-de-pele>>. Acesso em: 19 de junho de 2016.

COHN-CEDERMARK G.; MANSSON-BRAHME, E.; RUTQVIST, L.E., et al. Outcomes of patients with local recurrence of cutaneous malignant melanoma. *Cancer*, New York, v. 80, n. 8, p. 1418-1425, 1997.

COLLINS, A.T.; BERRY, P.A.; HYDE, C., et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Research*, v. 65, n. 23, p. 10946-10951, 2005.

COWAN, C.A.; KLIMANSKAYA, I.; MCMAHON, J., et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *New England Journal of Medicine*, v.350, n. 13, p.1353-1356, 2004.

CREIGHTON, C.J.; LI, X.; LANDIS, M., et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, v. 106, n. 33, p. 13820-13825, 2009.

CRIADO, P.R.; VASCONCELOS, C.; SITTART, J.A.S., et al. Melanoma maligno cutâneo primário: Estudo retrospectivo de 1963 a 1997 no Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo. *Rev Ass Médica Brasil*, v. 45, n. 2, p. 157-162, 1999.

CURRY, E. L.; MOAD, M.; ROBSON, C.N., et al. Using induced pluripotent stem cells as a tool for modelling carcinogenesis. *World Journal Stem Cells*, v. 7, n. 2, p. 461-469, 2015.

DAI, W.; TAN, X.; SUN, C., et al. High Expression of SOX2 Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Salivary Gland Adenoid Cystic Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, v.15, n. 5, p.8393-8406, 2014.

DALERBA, P.; DYLLA, S.J.; PARK, I.K., et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 24, 10158-10163, 2007.

DARINI, C.Y.; PISANI, D.F.; HOFMAN. P., et al. Self renewal gene tracking to identify tumour-initiating cells associated with metastatic potential. *Oncogene*, v.31, n. 19, p.2438-2449, 2012.

DARR, H.; MAYSHAR, Y.; BENVENISTY, N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development*. v. 133, n. 6, p.1193-1201, 2006.

DE VRIES, E.; BRAY, F.I.; COEBERGH, J.W. et al. Changing epidemiology of malignant melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *International Journal Cancer*, v. 107, p. 119- 126, 2003.

DENNIS, L.K.; VANBEEK, M.J.; FREEMAN, L.E.B., et al. Sunburns and risk of cutaneous melanoma, does age matter: a comprehensive meta-analysis. *Ann Epidemiol*, v. 18, n. 8, p. 614-627, 2008.

DIMATOS D.C.; DUARTE F.O.; VIEIRA V.J. et al. Melanoma cutâneo no Brasil. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, v. 38, Sup.1, p. 14-19, 2009.

DONG Y.; CAO, J.; WANG, H., et al. Nitric oxide enhances the sensitivity of alpaca melanocytes to respond to alpha-melanocyte-stimulating hormone by up-regulating melanocortin-1 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Orlando, v. 396, n. 4, pp. 849-853, 2010.

DUNCAN, L.M. The classification of cutaneous melanoma. *Hematology Oncology Clinics of North America*, v. 23, n. 3, p. 501-513, 2009.

DUVIVIER, A. Atlas de Dermatologia Clínica. 2.ed. São Paulo, Manole LTDA, 1997.

EISTERER W.; JIANG, X.; CHRIST O., et al. Different subsets of primary chronic myeloid leukemia stem cells engraft immunodeficient mice and produce a model of the human disease. *Leukemia*, v. 19, n. 3, p. 435-441, 2005.

ELWOOD M.; GALLACHER R.P. Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to patterns of sun exposure. *International Journal Cancer*, n. 78, p. 276-280, 1998.

ENOKIHARA, M.Y.; GOMES, E.E. Prevenção. Wainstein AJA, Belfort FA, editors. In: *Melanoma: Prevenção, Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento*. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2014, p. 35-41.

FANG, D. NGUYEN, T.K.; LEISHEAR, K., et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Research*, v. 65, n. 20, p. 9328-9337, 2005.

FERNANDES, N.C.; CALMON, R.; MACEIRA, J.P., et al. Melanoma Cutâneo: Estudo prospectivo de 65 casos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 80, n. 1, p. 25-34, 2005.

FERRARI JÚNIOR, N.M.; MULLER, H.; RIBEIRO, M., et al. Cutaneous melanoma: descriptive epidemiological study. *São Paulo Medical Journal*, 126, n. 1, p. 41-47, 2008.

FORD, D.; BLISS, J.M.; SWERDLOW, A.J., et al. Risk of cutaneous melanoma associated with a family history of the disease. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *International Journal Cancer*, v. 62, p. 377-381, 1995.

FORMAN, S.B.; FERRINGER, T.C.; PECKHAM, S.J., et al. Is superficial spreading melanoma still the most common form of malignant melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 58, n. 6, p. 1013-1020, 2008.

FRANCKEN, A.B.; SHAW, H.M.; THOMPSON, J.F., et al. The prognostic importance of tumor mitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous melanoma and long follow-up. *Annals of Surgical Oncology*, v. 11, n. 4, p. 426-433, 2004.

GANDINI, S.; SERA, F.; CATTARUZZA, M.S., et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *European Journal of Cancer*, v. 41, n. 1, p. 28-44, 2005.

GAO Y.; WANG X.; HAN J., et al. The novel OCT4 spliced variant OCT4B1 can generate three protein isoforms by alternative splicing into OCT4B. *Journal Genetics and Genomics*, v. 37, n. 7, p. 461-465, 2010.

GARBE, C.; EIGENTLER, T.K. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of art 2006. *Melanoma Research*, v. 17, n. 2, p. 117-127, 2007.



GARBE, C.; EIGENTLER, T.K.; KEILHOLZ, U., et al. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist*, v.16, n. 1, p.5-24, 2011.

GARBE, C.; MMLEOD, G.R.; BUETTNER PG. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer*, v. 89, n. 6, p. 1269-1278, 2000.

GELLER, A.C.; ELWOOD, M.; SWETTER, S.M., et al. Factors related to the presentation of thin and thick nodular melanoma from a population-based cancer registry in Queensland Australia. *Cancer*, v.115, n. 6, p. 1318-1327, 2009.

GERRARD, L.; ZHAO, D.; CLARK A.J., et al. Stably transfected human embryonic stem cell clones express OCT4-specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and pluripotency. *Stem Cells*, v. 23, n. 1, p. 124-33, 2005.

GIBBS, C.P.; KUKEKOV, V.G.; REITH, JD., et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia*, v. 7, n. 11, p. 967-976, 2005.

GIBLIN, A.V.; THOMAS, J.M. Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma. *Journal of Plastic, Reconstructive Aesthetic Surgery*, v. 60, n. 1, p. 32-40, 2007.

GIMOTTY, P.A.; ELDER, D.E.; FRAKER, D.L., et al. Identification of high-risk patients among those diagnosed with thin cutaneous melanomas. *Journal of Clinical Oncology*, v. 25, n. 9, p. 1129-1134, 2007.

GINESTIER, C; HUR, M.H.; CHARAFE-JAUFFRET, E., et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, v. 1, n. 5, p. 555-567, 2007.

GOLDSMITH, L. A. Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin. 2. ed. New York: Oxford University Press, p.320-324, 1991.

GON, A.S.; MINELLI, L.; GUEMBAROVSKI, A.L. Melanoma cutâneo primário em Londrina. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 76, n. 4, p. 413-426, 2001.

GRAY-SCHOPFER V.C.; CHEONG, S.C.; CHONG H., et al. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *British Journal of Cancer*. vol. 95, n. 4, p. 496-505, 2006.

GRUPO BRASILEIRO DE MELANOMA. Disponível em: <<http://www.gbm.org.br/>> Acessado em agosto de 2016.

GUEDES, R.A.V; BUZAID, A.C. Análise Crítica do Estadiamento e do Prognóstico. Wainstein AJA, Belfort FA, editors. In: *Melanoma: Prevenção, Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento*. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 203-211, 2014.

GUO, Y.; LIU, S.; WANG, P., et al. Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. *Histopathology*, v. 59, n. 4, p. 763-775, 2011.

HAASS N.K.; HERLYN M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, v. 10, n. 2, p. 153-63, 2005.

HABU, N.; IMANISHI, Y.; KAMEYAMA, K., et al. Expression of Oct3/4 and Nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, v.15, n.730, 2015.

HALE, C. Skin-melanocytic tumor, Miscellaneous, Breslow's system for tumor thickness. *PathologyOutlines.com, Inc.*, 2013. Disponível em: <<http://pathologyoutlines.com/topic/skintumormelanocyticbreslow.html>>. Acesso em 20 de junho de 2016.

HALL, H.I.; MILLER, D.R.; ROGERS, J.D., et al. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 40, p. 35-42, 1999.

HAMMACHI, F.; MORRISON, G.M.; SHAROV, A.A., et al. Transcriptional activation by Oct4 is sufficient for the maintenance and induction of pluripotency. *Cell Reports*, v. 1, n. 2, p. 99-109, 2012.

HARRIS, M.I.N.C. *Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento*. 3.ed. São Paulo: Senac, 2009.

HASSIOTOU, F.; HEPWORTH, A.R.; BELTRAN, A.S.; et al. Expression of the pluripotency transcription factor OCT4 in the normal and aberrant mammary gland. *Frontiers in Oncology*. v.3, n.79, p.1-15, 2013.

HATANO S.Y.; TADA, M.; KIMURA, H., et al. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mechanisms of Development*, v. 122, n. 1, p. 67-79, 2005.

HATEFI, N.; NOURAEI, N.; PARVIN, M., et al. Evaluating the Expression of Oct4 as a Prognostic Tumor Marker in Bladder Cancer, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, v. 15, n. 6, p. 1154–1161, 2012.

HAYWARD, N.K. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene*, v. 22, n. 20, p. 3053-3062, 2003.

HICKS M.J.; FLAITZ C.M. Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. *Oral Oncology*, v. 36, n. 2, p.152-169, 2000.

HOPE, K.J.; JIN, L.; DICK, J.E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nature Immunology*, v. 5, n. 7, p. 738-743, 2004.

HUANG, C.F.; XU, X.R.; WU, T.F., et al. Correlation of ALDH1, CD44, OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. *Journal of Oral Pathology e Medicine*, v.43, n. 7, p.492-498, 2014.

HUANG, E.H.; HEIDT, D.G.; LI, C.W., et al. Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor progression and therapeutic resistance. *Surgery*, v. 141, n. 4, p. 415-419, 2007.

HUI, S.K.; TANG, W.Y.; WONG, T.W., et al. Cutaneous melanoma: a population-based epidemiology report with 989 patients in Hong Kong. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 32, n. 3, p. 265-267, 2007.

HYSLOP L, STOJKOVIC M, ARMSTRONG L, et al. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells*, v. 23, n. 8, p. 1035-1043, 2005.

INCA - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Registros de câncer de base populacional. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/estatisticas/site/home/rcbp/>>. Acessado em: 6 de maio de 2016.

INCA – Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Incidência do câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>> Acessado em: 18 de abril de 2016a.

INCA – Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tipos de câncer: pele melanoma. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma/definicao+>](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao+>)>. Acessado em: 18 de junho de 2016b.

ISAACS, J.T. Role of programmed cell death in carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, v. 101, suppl. 5, p. 27-34, 1993.

ISLAM, F.; QIAO B.; SMITH, R.A, et al. Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 98, n. 2, p.184–191, 2015.

JANSEN, L.; KOOPS, H.S.; NIEWEG, O.E., et al. Sentinel node biopsy for melanoma in the head and neck region. *Head Neck*, v. 22, n. 1, p. 27-33, 2000.

JEMAL A, DEVESA SS, HARTGE P, TUCKER MA. Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 93, p. 678-683, 2001.

JEMAL A, SARAIYA M, PATEL P, et al. Recent trends in cutaneous melanoma incidence and death rates in the United States, 1992-2006. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 65, n. 5, p. S17-25, 2011.

JEN, M.; MURPHY, M.; GRANT-KELS, J. Childhood melanoma. *Clinics in Dermatology*, v. 27, n. 6, p. 529- 536, 2009.

JORDAN, C.T.; GUZMAN, M.L.; NOBLE, M. Mechanisms of the disease: Cancer Stem Cells. *The New England Journal of Medicine*, v. 355, p. 1253-1261, 2006.

JÚNIOR MEIRA, J.D.; ABBADE, L.P.F.; STOLF, H. As múltiplas faces do melanoma cutâneo primário: série de casos. *Diagnóstico e Tratamento*, v. 20, n. 3, p. 95-99, 2015.

JUNIOR SANCHES, J.A.; SIQUEIRA, A.C.L. Estadiamento Inicial. Wainstein AJA, Belfort FA, editors. In: *Melanoma: Prevenção, Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento*. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2014, p. 197-201.

KALKHORAN, S.; MILNE, O.; ZALAUDEK I., et al. Historical, clinical, and dermoscopic characteristics of thin nodular melanoma. *Archives of Dermatology*, v. 146, n. 3, p. 311-318, 2010.

KAROUBI, G.; GUGGER M.; SCHMID, R., et al. OCT4 expression in human non-small cell lung cancer: implications for therapeutic intervention. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, v. 8, p. 393–397, 2009.

KHAN, B.A.; AKHTAR, N.; RASUL, A., et al. Human skin, aging and antioxidants. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 6, n, 1, p. 1-6, 2012.

KIM R.J.; NAM, J.S. OCT4 Expression Enhances Features of Cancer Stem Cells in a Mouse Model of Breast Cancer. *Laboratory Animal Research*. v. 27, n. 2, p. 147-152, 2011.

KIMSEY, T.F.; COHEN, T.; PATEL, A., et al. Microscopic satellitosis in patients with primary cutaneous melanoma: implications for nodal basin staging. *Annals of Surgical Oncology*, v. 16, n. 5, p. 1176-1183, 2009.

KOBAYASHI, N. C. C.; NORONHA, S. M. R. Cancer stem cells: a new approach to tumor development. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 61, n.1, p.86-93, 2015.

KONRAD, P.; FABRIS, M.R.; MELAO, S. Perfil epidemiológico e histopatológico dos casos de melanoma cutâneo primário diagnosticado em Criciúma no período entre 2005 e 2007. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v. 86, n. 3, p.457-461, 2011.

KOO, B. S.; LEE, S.H.; KIM, J.M., et al. Oct4 is a critical regulator of stemness in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene*, v. 34, n. 18, p. 2317-2324, 2015.

KRATHEN M. Malignant melanoma: advances in diagnosis prognosis and treatment. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 31, n. 1, p.45-49, 2012.

KRISHNAMURTHY, S.; NOR, J. E. Head and neck cancer stem cells. *Journal of Dental Research*, v.91, n.4, p.334-40, 2012.

KUPHAL, S.; BOSSERHOFF, A. Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma. *The Journal Pathology*, v. 219, n. 4, p. 400-409, 2009.

LANDMAN, G. Patologia do Linfonodo Sentinela. Wainstein AJA, Belfort FA, editors. In: Melanoma: Prevenção, Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 191-196, 2014.

LAPA, M.S.; GUEDES, K.F.; SCHALCH, F.O., et al. Melanomas malignos cutâneos tratados no Hospital de Câncer de São Paulo. Estudo retrospectivo para avaliação, fatores prognósticos e sobrevida. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 77, p. 313-20, 2002.

LASHITIOTAKIS, K.G.; LEITER, U.; GORKIEVICZ, R., et al. The incidence and mortality of cutaneous melanoma in Southern Germany: trends by anatomic site and pathologic characteristics, 1973 to 2003. Cancer, v. 107, n. 6, p.1331-1339, 2006.

LEITER, U.; BUETTNER, P.G.; EIGENTLER, T.K., et al. Prognostic factors of thin melanoma: an analysis of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. Journal of Clinical Oncology, v. 22, n. 18, p. 3660-3667, 2004.

LEON, P.; DALY, J.M.; SYNNESTVEDT, M. et al. The prognostic implications of microscopic satellites in patients with clinical stage I melanoma. Archives of Surgery, v. 126, n. 12, p. 1461-1468, 1991.

LEVIT, E.K.; KAGEN, M.H.; SCHER, R.K, et al. The ABC rule for clinical detection of subungual melanoma. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 42, n. 2pt 1, p. 269-274, 2000.

LI, C.; HEIDT, D.G.; DALERBA, P., et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer Research, v. 67, n. 3, p. 1030-1037, 2007.

LIANG, J.J.; ROBINSON, E.; MARTIN, R.C. Cutaneous melanoma in New Zealand: 2000-2004. ANZ Journal of Surgery, v. 80, n. 5, p. 312-136, 2010.

LINDHOLM, C.; ANDERSON, R.; DUFMATS, M., et al. Invasive cutaneous malignant melanoma in Sweden, 1990-1999. A prospective, population-based study of survival and prognostic factors. Cancer, v. 101, p. 2067-2078, 2004.

LING, G.Q.; CHEN, D.B.; WANG, B.Q., et al. Expression of the pluripotency markers Oct3/4, Nanog and Sox2 in human breast cancer cell lines. Oncology letters, v. 4, n. 6, p. 1264-1268, 2012.

LINN D.E.; YANG, X.; SUN F, et al. A Role for OCT4 in Tumor Initiation of Drug-Resistant Prostate Cancer Cells. Genes Cancer, v. 1, n. 9, p. 908-916, 2010.

LIPSKER, D.M.; HEDELIN, G.; HEID, E. et al. Striking increase of thin melanoma contrasts with stable incidence of thick melanoma. Archives of Dermatology, v. 135, n. 12, p.1451-1456, 1999.

LIU, W.; DOWLING, J.P.; MURRAY, W.K., et al. Rate of growth in melanomas: characteristics and associations of rapidly growing melanomas. *Archives of Dermatology*, v. 142, n. 12, p.1551-1558, 2006.

LORIA, D.; MATOS, E. Risk factors for cutaneous melanoma: a case-control study in Argentina. *International Journal Dermatology*, v. 40, p.106-114, 2001.

LOWE, S. W.; LIN, A. W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, v. 21, n. 3, p. 485-495, 2000.

LU, Y.; ZHU, H.; SHAN, H., et al. Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. *Cancer Letters*, v. 340, n. 1, p. 113-123, 2013.

LUCO, D. P. Padronização de técnicas de isolamento de células de Langerhans imaturas e desenvolvimento de um modelo tridimensional de pele humana para testes de sensibilidade in vitro. 98f, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo.

MACKIE R.M.; BRAY CA.; HOLE D.J., et al. Incidence of and survival from malignant melanoma in Scotland: an epidemiological study. *Lancet*, v. 360, n. 9333, p.587-591, 2002.

MACKIE, R.; HUNTER, J.A.; AITCHISON, T.C., et al. Cutaneous malignant melanoma, Scotland, 1979-89. The Scottish Melanoma Group. *The Lancet*, v. 339, p. 971-975, 1992.

MACKIE, R.M.; HAUSCHILD, A.; EGGERMONT, A.M.M. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Annals of Oncology*, v. 20(Suppl 6):vi1–vi7, 2009.

MAIA, M.; FUNCHAL, C.S.R.Z.; FERRARI, N.M., et al. Melanoma acrolentiginoso: um desafio ao diagnóstico precoce. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78, n. 5, p. 553-560, 2003.

MAJOR, A. G.; PITTY, L.P.; FARAH, C.S. Cancer Stem Cell Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Stem Cells International*. 13pages. 2013.

MANOLA, J.; ATKINS, M.; IBRAHIM, J. et al. Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. *J Clin Oncol*, v. 18, n. 22, p. 3782-3793, 2000.

MARGHOOB, A.A.; KOENIG, K.; BITTENCOURT, F.V., et al. Breslow thickness and clark level in melanoma: support for including level in pathology reports and in American Joint Committee on Cancer Staging. *Cancer*, v. 88, n. 3, p. 589-595, 2000.

MARIANTE J.C. Alterações clínicas, dermatoscópicas, histopatológicas e imunohistoquímicas de nevos melanocíticos irradiado com raios ultravioleta B. 144f. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MARKS R, Prevention and control of melanoma: the public health approach. Ca: A Cancer Journal for Clinicians, v. 46, n. 4, p. 199-216, 1996.

MARTINI, F.H.; NATH, J.L.; BARTHOLOMEW, E.F. Chapter 5 - The Integumentary System. In: Fundamentals of Anatomy and Physiology. 9. ed, Ed. Benjamin-Cummings Publishing Company, 1264p, 2010.

MASUI, S.; NAKATAKE, Y.; TOYOOKA, Y., et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. Nature Cell Biology, v. 9, n. 6, p. 625-635, 2007.

MATSUI, W. HUFF, C.A.; WANG, Q., et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. Blood, v. 103, n.6, p. 2332-2336, 2004.

MAYS, M.P.; MARTIN, R.C.; BURTON, A., et al. Should all patients with melanoma between 1 and 2 mm Breslow thickness undergo sentinel lymph node biopsy? Cancer, v. 116, n. 6, p. 1535-1544, 2010.

METELITSA, A.I.; DOVER, D.C.; SMYLIE, M., et al. A population-based study of cutaneous melanoma in Alberta, Canada (1993-2002). Journal of American the Academy of Dermatology, v. 62, n. 2, p. 227-232, 2010.

MEYLE K.D.; GULDBERG P. Genetic risk factors for melanoma. Human Genetics, v. 126, n. 4, p. 499-510, 2009.

MICHALANY, N.S. Exame Anatomopatológico da Lesão Primária. Wainstein AJA, Belfort FA, editors. In: Melanoma: Prevenção, Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 161-170, 2014.

MILLER, A.J.; MIHM, M.C.J. Melanoma. The New England Journal of Medicine, v. 355, n. 1, p. 51-65, 2006.

MIOT, L.D.B.; MIOT, H.A; SILVA M.G., et al. Fisiopatologia do melasma. Anais. Brasileiro de Dermatologia, v. 84, n.6, p. 623-635, 2009.

MIYAZAWA K.; TANAKA, T.; NAKAI, D., et al. Immunohistochemical expression of four different stem cell markers in prostate cancer: High expression of NANOG in conjunction with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression is involved in prostate epithelial malignancy. Oncology Letters, v. 8, n. 3, p. 985-992, 2014.

MOGHBELI, M.; MOGHBELI, F.; FORGHANIFARD, M.M., et al. Cancer stem cell detection and isolation. Medical Oncology, v.31, n. 9, p.69-75, 2014.

MORENO, M.; BATISTA, F.R.B.; BONETTI, T.C. Sobrevida de Pacientes com Melanoma Cutâneo na Região Oeste de Santa Catarina, Brasil. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 58, n. 4, p. 647-653, 2012.

MURALI, R.; MONCRIEFF, M.D.; HONG, J, et al. The prognostic value of tumor mitotic rate and other clinicopathologic factors in patients with locoregional recurrences of melanoma. Annals of Surgical Oncology, v. 17, n. 11, p. 2992-2999, 2010.

NAGORE, E.; OLIVER, V.; BOTELLA-ESTRADA, R., et al. Clinicopathological analysis of 1571 cutaneous malignant melanoma in Valencia, Spain: factors related to tumour thickness. *Acta Dermato-Venerologica*, v. 86, p. 50-56, 2006.

NARAYANAN, D.L.; SALADI, R.N.; FOX, J.L. Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology*, v. 49, n. 9, p. 978–986, 2010.

NASSER N. Epidemiologia do melanoma maligno em Blumenau-SC. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 68, n.1, p.17-20, 1993.

NICOLINI, A.; FERRARI, P.; FINI, M., et al. Stem cells: their role in breast cancer development and resistance to treatment. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 12, n. 2, p. 196-205, 2011.

OAKLEY, A. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. DermNet NZ. Site da internet. 2016. Disponível em: <<http://www.dermnetnz.org/lesions/lentigo-maligna.html>>. Acesso em: 14 de junho de 2016.

OLIVEIRA FILHO, R.S.; FERREIRA, L.M.; BIASI, L.J., et al. Vertical growth phase and positive sentinel node in thin melanoma. *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, v. 36, n. 3, p. 347-350, 2003.

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em: <<http://www.omim.org/entry/607937?search=nanog&highlight=nanog>> Acessado em 20 de agosto de 2016b.

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em: <<http://www.omim.org/entry/164177?search=oct4&highlight=oct4>> Acessado em 15 de agosto de 2016a.

PAEK, S.C.; SOBER, A.J.; TSAO H.T, et al. Cutaneous melanoma. In: Wolf K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in general medicine*. New York: MM Graw Hill, p. 1134-1157, 2008.

PAPAGERAKIS, S.; PANNONE, G.; ZHENG, L., et al. Oral epithelial stem cells – implications in normal development and cancer metastasis. *Experimental Cell Research*, v.325, n.2, p.111–129, 2014.

PARK CC.; BISSELL M.J.; BARCELLOS-HOFF, M.H. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Molecular Medicine Today*. v. 6, n. 8, p. 324-329, 2000.

PARK, H.Y.; KOSMADAKI, M.; YAAR, M., et al. Cellular mechanism regulating human melanogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, n. 9, p. 1493-1506, 2009.

PARK, S, H.O.; GOO, J.M.; JO, CH. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve: Practical Review for Radiologists. *Korean Journal Radiol*, v. 5, n. 11, p. 11-18, 2004.



PASTORINO, L.; BONELLI, L.; GHIORZO, P., et al. CDKN2A mutations and MC1R variants in Italian patients with single or multiple primary melanoma. *Pigment Cell Melanoma Research*, v. 21, n. 6, p. 700-709, 2008.

PASZKOWSKA-SZCZUR, K.; SCOTT, R.J.; SERRAN-FERNANDEZ P., et al. Xeroderma pigmentosum genes and melanoma risk. *International Journal of Cancer*, v. 133, n. 5, p.1094-1100, 2013.

PCDS – Primary Care Dermatology Society. Site da internet. 2016. Disponível em: <<http://www.pcds.org.uk/clinical-guidance/nodular-melanoma>>. Acesso em: 16 de junho de 2016.

PELLE DIGITALE DERMATOLOGIA. Site da internet. 2011. Disponível em: <<http://www.pelledigitale.com.br/melanoma.html>>. Acesso em: 14 de junho de 2016.

PESCE, M.; SCHOLER, H.R. Oct-4: Gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*, v. 19, p. 271–278, 2001.

POLLACK, L.A.; LI, J.; BERKOWITZ, Z., et al. Melanoma survival in the United States, 1992 to 2005. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 65, n. 5, p. S78-86, 2011.

POLYAK, K.; HAHN, W.C. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nature Medicine*, v. 12, n. 3, p. 296-300, 2006.

PRINCE, M.E.; SIVANANDAN, R.; KACZOROWSKI, A., et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 3, p. 973-978, 2007.

PRUTHI, D.K.; GUILFOYLE, R.; NUGENT, Z., et al. Incidence and anatomic presentation of cutaneous malignant melanoma in central Canada during a 50-year period: 1956 to 2005. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 61, n. 1, p. 44-50, 2009.

RAIMONDI, S.; SERA, F.; GANDINI, S., et al. MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: A meta-analysis. *International Journal of Cancer*, v. 122, n. 12, p. 2753-2760, 2008.

RAVINDRAN, G.; SAWANT, S.S.; HAIA, A., et al. Association of differential b-catenin expression with Oct-4 and Nanog in oral squamous cell carcinoma and their correlation with clinicopathological factors and prognosis. *Head Neck*, v. 37, n. 7, p. 982-993, 2015.

REYA, T.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F.; WEISSMAN, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, v. 1, n. 414, p. 105-111, 2001.

RICCARDI, F.; GIORDANI, D.N.S. Biópsia. Wainstein AJA, Belfort FA, editors. In: *Melanoma: Prevenção, Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento*. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 155-160, 2014.

RYCAJ, K.; TANG, D.G. Cancer stem cells and radioresistance. *International Journal of Radiation Biology*, v.90, n. 8, p.615–662, 2014.

SABATINO M.; STRONCEK D.F.; KLEIN, H., et al. Stem Cells in melanoma development. *Cancer Letters*, v. 279, n. 2, p. 119-125, 2009.

SANTOS, I.D.A.O.; OLIVEIRA, A.F.O. Tratamento da Lesão Primária. Wainstein AJA, Belfort FA, editors. In: *Melanoma: Prevenção, Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento*. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 219-225, 2014.

SATPUTE, P. S.; HAZAREY, V.; AHMED, R., et al. Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v.14, n.10, p.5579-5587, 2013.

SCHATTON T.; FRANK MH. Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research*, v. 21, n. 1, p. 39-55, 2008.

SCHATTON, T., MURPHY, G.F., FRANK, N.Y., et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, v. 451, n. 7176, p. 345-349, 2008.

SCOGGINS C.R.; ROSS, M.I.; REINTGEN, D.S., et al. Gender-related differences in outcome for melanoma patients. *Annals of Surgery*, v. 243, n. 5, p. 693-698, 2006.

SCOGGINS, C.R.; BOWEN, A.L.; MARTIN, R.C., et al. Prognostic information from sentinel lymph node biopsy in patients with thick melanoma. *Archives of Surgery*, v. 145, n. 7, p. 622-627, 2010.

SEKULIK, A.; HALUSKA, Jr.P.; MILLER, A.J, et al. Malignant melanoma in the 21st century: The emerging molecular landscape. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 83, n. 7, p. 825-846, 2008.

SELL, S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 51, n. 1, p. 1-28, 2004.

SHIPITSIN, M.; POLYAK, K. The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers and relevance. *Laboratory Investigation*, v. 88, n. 5, p. 459-63, 2008.

SINGH, S.K.; CLARKE, I.D.; HIDE, T.; DIRKS, P.B. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, v. 23, n. 43, p. 7267-7273, 2004.

SINHA, N.; MUKHOPADHYAY, S.; DAS D.N, et al. Relevance of cancer initiating/stem cells in carcinogenesis and therapy resistance in oral cancer. *Oral Oncology*, v.49, n.9, p.854–862, 2013.

SKENDER-KALNENAS T.M.; ENGLISH D.R.; HEENAN P.J. Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma? *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 33, n. 6, p. 1000-1007, 1995.

SLOMINSKI A.; ROSS J.; MIHM M.C. Cutaneous melanoma: pathology, relevant prognostic indicators and progression. *British Medical Bulletin*, v. 51, n. 3, p. 548-569, 1995.

SMALBERGER, G.J.; SIEGEL, D.M.; KHACHEMOUNE, A. Lentigo maligna. *Dermatology and Therapy*, v. 21, n. 6, p. 439-446, 2008.

SORTINO-RACHOU, A.M.; CURADO, M.P.; LATORRE, M.R.D.O. Melanoma cutâneo: estudo de base populacional em Goiânia, Brasil de 1988 a 2000. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v. 81, n. 5, p. 449-455, 2006.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life Sciences*, v. 67, p. 477-502, 2000.

STALKUP, J.R.; ORENGO, I.F.; KATTA, R. Controversies in acral lentiginous melanoma. *Dermatologic Surgery*, v. 28, n. 11, p. 1051–1059, 2002.

STARK, H.J.; BAUER, M.; BREITKREUTZ, D., et al. Organotypic keratinocyte coculture in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 112, n.5, p. 681-691, 1999.

SUPP D.M.; BOYCE S.T. Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clinical Dermatology*, v. 23, n.4, p. 403–412, 2005.

SZAFAROWSKI, T.; SZCZEPANSKI, M.J. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngologia Polska*. v.68, p.105-111, 2014.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. v.126, n.4, p.663–676, 2006.

THOMAS, A.; CHENG, L. Role of immunohistochemical expression of OCT4 in ovarian dysgerminoma. *Elsevier (USA)*, v.23, p. 493-498, 2005.

THORN M, PONTÉN F, BERGSTRÖM R, SPARÉN P, ADAMI HO. Clinical and histopathologic predictors of survival in patients with malignant melanoma: a population-based study in Sweden. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 86, n. 10, p. 761-769, 1994.

TODARO, M.; ALEA, M.P.; DI STEFANO, A.B., et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell*. v.1, n. 4, p.389–402, 2007.

TORTORA, J.G.; NIELSEN, T. Capítulo 5. Tegumento. In: *Princípios de Anatomia Humana*, 12 ed. Ed. Guanabara Koogan, p. 123-135, 2013.

TSAI, L.L.; HU, F.W.; LEE S.S.; et al. Oct4 Mediates Tumor Initiating Properties in Oral Squamous Cell Carcinomas through the Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition. *Plos One*, v.9, n.1, e87207, 2014.

TSAO H.; SOBER J.A. Melanoma Treatment Update. *Dermatologic Clinics*, v. 23, n. 2, p. 323-333, 2005.

VENEGAS, L.F.P.; FLORES, C.; BLACHER, G.G., et al. Melanoma maligno cutâneo no Rio Grande do Sul: estudo de 101 casos. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 38, p. 122-126, 1992.

WAGNER, J.D.; GORDON, M.S.; CHUANG, T., et al. Current therapy of cutaneous melanoma. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 105, p. 1774-1799, 2000.

WANG X.; DAI J. Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem Cells*. v. 28, n. 5, p. 885-893, 2010.

WANG, D.; LU, P.; ZHANG, H., et al. Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget*, v. 5, n. 21, p. 10803-10815, 2014.

WANG, Y.D.; CAI, N.; WU X.L., et al. OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death Dis*, v. 4, n. 8, p. e760, 2013.

WEINSTOCK M.A.; MIKKILINEMI R. Skin cancer. *Epidemiology*. American Cancer Society Atlas of Clinical Oncology In: Sober AJ, Haluska FG, editors. London: BC Decker, p. 1-15, 2001.

WHO - World Health Organization. Ultraviolet radiation and the INTERSUN Programme. Disponível em: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>. Acessado em 22 de maio de 2016.

WICHA, M.S., LIU S., DONTU, G. Cancer stem cells: An oldidea- A paradigm shift. *Cancer Research*. v. 66, n. 4, p. 1883–1890, 2006.

WILLIAMS I.; KUPPER, T. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sciences*, v. 58, n. 18, p. 1485-1507, 1996.

WILLIAMS, P.F.; OLSEN, C.M.; HAYWARD, N.K., et al. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis and estimates of population burden. *International Journal of Cancer*, v. 129, n. 7, p. 1730-1740, 2011.

WONG, SL, BALCH, CM, HURLEY, P, et al. Sentinel lymph node biopsy for melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology joint clinical practice guideline. *Journal of Clinical Oncology*, v. 30, n. 23, p. 2912-2918, 2012.

WU, G.; SCHOLER, H.R. Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regeneration*. v.3, n.7, p.1-10, 2014.

XIE, X.; PIAO, L.; CAVEY G.S., et al. Phosphorylation of Nanog is Essential to regulate Bmi1 and Promote Tumorigenesis. *Oncogene*. v. 33, n. 16, p. 2040-2052, 2013.

YAAR, M.; GILCHREST, B.A. Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 26, n.7, p. 583-591, 2001.

YAO K, BALCH G., WINCHESTER D.J. Multidisciplinary Treatment of Primary Melanoma. *Surgical Clinics of North America*, v. 89, n. 1, p. 267-281, 2009.

YIN, X.; ZHANG, B.H.; ZHENG, S.S, et al. Coexpression of gene Oct4 and Nanog initiates stem cell characteristics in hepatocellular carcinoma and promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of Stat3/Snail signaling. *Journal of Hematology Oncology*, v. 8, n. 23, p. 1-13, 2015.

ZABIEROWSKI S.E.; HERLYN M. Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, v. 26, n. 17, p. 2890-2894, 2008.

ZAGER, J.S.; HOCHWALD, S.N.; MARZBAN, S.S, et al. Shave biopsy is a safe and accurate method for the initial evaluation of melanoma. *Journal of the American College of Surgeons*, v. 212, n. 4, p. 454-460, 2011.

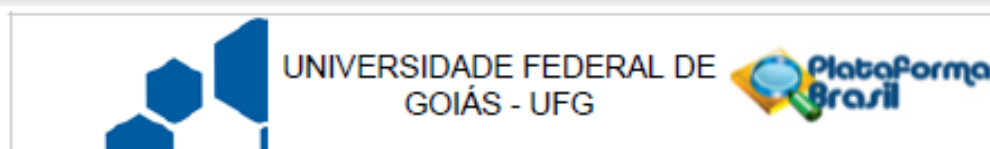
ZANGROSSI, S.; MARABESE, M.; BROGGINI, M., et al. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells*, v. 25, n. 7, p. 1675-1680, 2007.

ZHANG, L.; XIA, Y.; WANG, Y., et al. Cancer stem cell-like cells exist in mucoepidermoid carcinoma cell line. MC3. *Oncology Research*. v.20, n.12, p.589-600, 2012.

ZEINEDDINE, D.; HAMMOUD, A.A.; MORTADA, M.; et al. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *American Journal of Stem Cells*, v.3, n.2, p.74-82, 2014.

ZETTERSTEN, E.; SHAIKH, L.; RAMIREZ, R. et al. Prognostic factors in primary cutaneous melanoma. *Surgical Clinics of North America*, v. 83, n. 1, p. 61-75, 2003.

## 9.1 Anexo A – Parecer do Comitê de Ética – CEP/UFG



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DOS GENES OCT4 E NANOG EM AMOSTRAS DE MELANOMA CUTÂNEO

**Pesquisador:** Constanza Thaise Xavier Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 40068914.4.0000.5083

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Goiás - UFG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 981.740

**Data da Relatoria:** 23/02/2015

#### Apresentação do Projeto:

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DOS GENES OCT4 E NANOG EM AMOSTRAS DE MELANOMA CUTÂNEO. **Pesquisadora:** Constanza Thaise Xavier Silva. Trata-se de um estudo descritivo e analítico, com a utilização dos dados clínicopatológicos colhidos dos prontuários, e análises moleculares de espécimes de melanoma cutâneo incluídos em parafina, obtidas no Hospital Araújo Jorge - HAJ. Os documentos anexados foram: Folha de rosto, projeto de pesquisa, declaração da orientadora e co-orientadora, anuência do setor de arquivo médico do HAJ/ACCG.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo primário:** Avaliar os genes OCT4 e NANOG por imunohistoquímica em amostras de melanoma cutâneo de pacientes atendidos no Hospital Araújo Jorge em Goiânia – GO.

**Objetivos secundários:** Demonstrar a prevalência da expressão das proteínas OCT4 e NANOG em amostragem dentro da casuística; Analisar o padrão de expressão das proteínas OCT4 e NANOG utilizando a técnica de imunohistoquímica; Correlacionar a presença das proteínas com malignidade do melanoma cutâneo e prognóstico; Verificar a epidemiologia do melanoma cutâneo na população estudada; Descrever os dados epidemiológicos.

**Endereço:** Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131  
**Bairro:** Campus Samambala **CEP:** 74.001-970  
**UF:** GO **Município:** GOIANIA  
**Telefone:** (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpl.ufg@gmail.com

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **Riscos:**

A princípio, as análises realizadas neste estudo não implicarão em quaisquer modificações no tratamento da doença e em momento algum serão introduzidas condutas adicionais. Não foram previstos riscos ou transtornos evidentes aos pacientes do estudo, pois toda a pesquisa será realizada por meio de revisão de prontuários, manuseio dos respectivos blocos de parafina.

##### **Benefícios:**

Espera-se com o desenvolvimento deste projeto, uma descrição sistemática dos principais aspectos clínicos dos casos de melanoma cutâneo diagnosticados no HAJ, em Goiânia. Tais resultados permitirão o conhecimento do perfil dos pacientes com a doença e a implementação de um método de diagnóstico mais específico e eficiente.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo descritivo e analítico, com a utilização dos dados clinicopatológicos colhidos dos prontuários, e análises moleculares de espécimes de melanoma cutâneo incluídos em parafina, obtidas no Hospital Araújo Jorge - HAJ.

A seleção dos pacientes diagnosticados com melanoma cutâneo será realizada a partir da busca nos livros de registro informatizado do Setor de Anatomia Patológica do e do Setor de Melanoma e Pele do HAJ. Serão analisados espécimes cirúrgicos de lesões melanocíticas de pacientes de ambos os sexos, de todas as faixas etárias, operados entre 2000 até 2010 no HAJ. Através da revisão dos prontuários serão tabulados os seguintes dados clínicos:

sexo, idade, etnia, localização da lesão e índice de Breslow. De acordo com a localização da lesão, o melanoma será dividido em dois grupos: 1- Aquele localizado em pele sujeita a exposição solar intermitente ou pele raramente exposta, incluindo tronco, membros superiores, membros inferiores e região acral; 2- Aquele localizado em pele sujeita a exposição solar crônica como cabeça e pescoço. A partir dos blocos de parafina dos casos selecionados serão retirados cortes de com 5µm fixados em lâminas para a análise imunohistoquímica.

Tais dados clínicos serão correlacionados com os resultados da detecção da presença das proteínas OCT4 e NANOG por análise imunohistoquímica. As amostras em formol e incluídas em blocos de parafina encontram-se armazenadas no Serviço de Anatomia Patológica e no Setor de pele e tórax do HAJ. Todos os cuidados deverão ser tomados a fim de preservar e não esgotar os blocos de parafina contendo as amostras.

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131  
Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970  
UF: GO Município: GOIÂNIA  
Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpl.ufg@gmail.com

**Critério de Inclusão:**

Pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo comprovados histopatologicamente, que apresentem dados clínico-patológicos nos respectivos prontuários, blocos de parafina disponíveis no Serviço de Anatomia Patológica e no Setor de Melanoma e Pele do HAJ.

**Critério de Exclusão:**

Pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo sem comprovação histopatológica, com dados clínico-patológicos incompleta nos prontuários, cujos blocos não estejam disponíveis no Setor de Anatomia Patológica e no Setor de pele e Tórax do HAJ.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A pesquisadora descreve que os princípios enunciados na Declaração de Helsinque serão obedecidos durante a realização do trabalho, mantendo-se em sigilo a identidade dos pacientes, cujos dados serão identificados apenas pelo número de registro no projeto. A princípio, as análises realizadas neste estudo não implicarão em quaisquer modificações no tratamento da doença e em momento algum serão introduzidas condutas adicionais.

Propõe dispensa do TCLE, justificando que os dados clínico-patológicos serão coletados somente em prontuários e blocos de parafina (biopsias) correspondentes aos pacientes diagnosticados com melanoma cutâneo no HAJ, em Goiânia, a partir do ano 2000.

No entanto, vale ressaltar, caso os pacientes sejam institucionalizados deverá ser aplicado o TCLE solicitando a autorização para utilização dos blocos em parafinas para a realização da pesquisa.

**Cronograma:**adequado

**Orçamento:**segundo a pesquisadora o projeto será submetido às agências de fomento (FAPEG ou CNPq), tão logo sejam divulgados editais pertinentes a este tipo de pesquisa. Entretanto, a maior parte dos insumos necessários a este projeto já estão disponíveis no Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, pois são remanescentes de outros projetos financiados e já concluídos.

**Recomendações:**

Recomenda-se que: caso os pacientes sejam institucionalizados deverá ser aplicado o TCLE solicitando a autorização para utilização dos blocos em parafinas para a realização da pesquisa.



**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado, salvo melhor juízo deste Comitê.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Informamos que a Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS nº. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para janeiro de 2016.

GOIANIA, 24 de Fevereiro de 2015

---

**Assinado por:**  
**João Batista de Souza**  
**(Coordenador)**

<b>Endereço:</b> Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131			
<b>Bairro:</b> Campus Samambaia		<b>CEP:</b> 74.001-970	
<b>UF:</b> GO	<b>Município:</b> GOIANIA		
<b>Telefone:</b> (62)3521-1215	<b>Fax:</b> (62)3521-1163	<b>E-mail:</b> cep.prpl.ufg@gmail.com	

## 9.2 Anexo B – Parecer do Comitê de Ética – CEP/ACCG

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE  
AO CÂNCER EM GOIÁS -



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DOS GENES OCT4 E NANOG EM AMOSTRAS DE MELANOMA CUTÂNEO.

**Pesquisador:** Constanza Thaise Xavier Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 44990415.4.3001.0031

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Goiás - UFG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.110.213

**Data da Relatoria:** 11/06/2015

#### Apresentação do Projeto:

O câncer de pele é a neoplasia maligna de maior incidência em todo mundo. Estas neoplasias podem ser divididas entre as melanomas e as não-melanomas. Os melanomas, apesar de serem os de menor incidência entre as neoplasias cutâneas, são os que apresentam maior letalidade e índice de metastização (SOBER et al., 2001). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o melanoma corresponde a 25% dos tumores malignos registrados. É altamente heterogêneo e pode sofrer modificações fenotípicas em função da sua plasticidade e do microambiente. Devido à coexistência destas subpopulações celulares do tipo proliferativa e invasiva nos tumores melanoma, novos estudos podem esclarecer a atividade dos genes OCT4 e NANOG na tentativa de fornecer uma explicação para a resistência desse tipo de célula a quimioterapia. A plasticidade dessas células pode ainda levar a tumores secundários mesmo após a quimioterapia com células invasoras em estado proliferativo. É essencial caracterizar essas células invasoras a fim de definir novas terapias que possam permitir a eliminação tanto da subpopulação de células invasivas como as proliferativas (HAYWARD, 2003; SCHATTON; FRANK, 2008).

O estudo é descritivo e analítico, com a utilização dos dados clínico-patológicos colhidos dos prontuários, e análises moleculares de espécimes de melanoma cutâneo incluídos em parafina,

Endereço: 239  
Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO CEP: 74.605-070  
UF: GO Município: GOIÂNIA  
Telefone: (62)3243-7050 Fax: (62)3243-7050 E-mail: cepaccg@accg.org.br

Página 01 de 04

## ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS -



Continuação do Parecer: 1.110.213

obtidas no Hospital Araújo Jorge – HAJ. Inclui uma etapa retrospectiva e uma prospectiva. A primeira etapa visa investigar a presença da proteína OCT4 e NANOG em biópsias de pele de pacientes diagnosticado com melanoma cutâneo. Os casos a serem analisados deverão ser aqueles diagnosticados no Hospital Araújo Jorge (HAJ), a partir do ano 2000, que apresentem dados clínicos e histopatológicos satisfatórios e blocos de parafina de biópsia de pele disponíveis no Serviço de Anatomia Patológica do HAJ. A seleção será feita a partir de uma busca ativa nos livros de registros dos exames realizados no Setor de Anatomia Patológica e nos registros do Setor de melanoma e pele. A segunda etapa visa investigar a análise da presença das proteínas OCT4 e NANOG em biópsias de pele de pacientes diagnosticados com melanoma cutâneo.

### Objetivo da Pesquisa:

#### Objetivo primário

- Avaliar os genes OCT4 e NANOG por imunohistoquímica em amostras de melanoma cutâneo de pacientes atendidos no Hospital Araújo Jorge em Goiânia – GO.

#### Objetivos secundários

- Demonstrar a prevalência da expressão das proteínas OCT4 e NANOG em amostragem dentro da casuística;
- Analisar o padrão de expressão das proteínas OCT4 e NANOG utilizando a técnica de imunohistoquímica;
- Correlacionar a presença das proteínas com malignidade do melanoma cutâneo e prognóstico;
- Verificar a epidemiologia do melanoma cutâneo na população estudada;
- Descrever os dados epidemiológicos.

### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não foram previstos riscos ou transtornos evidentes aos pacientes do estudo, pois toda a pesquisa será realizada por meio de revisão de prontuários, manuseio dos respectivos blocos de parafina. Quanto aos benefícios, espera-se uma descrição sistemática dos principais aspectos clínicos dos casos de melanoma cutâneo diagnosticados no HAJ, em Goiânia. Tais resultados permitirão o conhecimento do perfil dos pacientes com a

### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Apesar da revisão de literatura ser sucinta, o projeto está claro e apresenta a justificativa e relevância do mesmo. A parte prospectiva de coleta de dados não está clara. Caso venham a ser incluídos pacientes com melanoma prospectivamente, será necessário convidar o paciente para

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO

CEP: 74.605-070

UF: GO

Município: GOIÂNIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepaccg@accg.org.br

Página 02 de 04

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE  
AO CÂNCER EM GOIÁS -



Continuação do Parecer: 1.110.213

participar do estudo e a assinatura do TCLE será necessária.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- Folha de rosto CONEP (Grande área 2), com assinatura da instituição proponente e da pesquisadora responsável (datada de 17/12/2014)
- Parecer consubstanciado do CEP / HC – UFG o qual aprova o projeto (datado de 25/05/2015!)
- Projeto de pesquisa com carimbo do IEP (datado de 03/12/2014)
- Carta de autorização do Chefe do Setor de Anatomia Patológica, Dr Élbio Cândido de Paulo, para realização da pesquisa (datada de 04/12/2014)
- Carta de autorização do responsável pelo Setor de Melanoma e Pele, Dr Saulo Machado de Paiva, para realização da pesquisa (datada de 04/12/2014)
- Carta de autorização do Setor de Arquivo Médico do HAJ/ACCG, assinado por Alessandra de Sousa C. Prado, para manuseio dos prontuários (datada de 04/12/2014)
- Carta de solicitação de autorização da Diretoria Técnica do Hospital Araújo Jorge para realização da pesquisa (datada de 02/12/2014)
- Carta de autorização do Diretor Técnico do Hospital Araújo Jorge, Dr Márcio Roberto Barbosa da Silva, para realização da pesquisa (datada de 12/12/2014)
- Carta da orientadora e co-orientadora assegurando que acompanharão a pesquisadora responsável (datada de 04/12/2014)
- Carta de encaminhamento do projeto ao CEP da ACCG (data de 11/12/2014)
- Carta de esclarecimento de sigilo e confidencialidade da pesquisadora responsável (datada de 02/12/2014)
- Carta da pesquisadora responsável comprometendo-se a aguardar o parecer do CEP/ACCG para iniciar a condução da pesquisa e que zelará pelo cumprimento dos princípios éticos vigentes (datada de 04/12/2014)
- Declaração de compromisso da pesquisadora responsável assegurando que apresentará os resultados finais junto à Plataforma Brasil (datada de 04/12/2014)
- Termo de compromisso da equipe executora, com assinatura de todos os membros da equipe (datada de 04/12/2014)
- Currículo Lattes de Constanza Thaise Xavier Silva (datado de 04/maio/2015)
- Currículo Lattes de Vera Aparecida Saddi (atualizado em 17/03/2015)
- Currículo Lattes de Jalsi Tacon Arruda (datado de 24/04/2015)
- Currículo Lattes de Lidia Andreu Guillo (datado de 31/03/2015)
- Currículo Lattes de Ailton Cabral Fraga Júnior (datado de 30/09/2010)

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO

CEP: 74.605-070

UF: GO

Município: GOIÂNIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepaccg@accg.org.br

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE  
AO CÂNCER EM GOIÁS -



Continuação do Parecer: 1.110.213

Por se tratar de um estudo retrospectivo, o TCLE é dispensável. No entanto, caso venham a ser incluídos novos pacientes a partir do momento a aprovação deste projeto no CEP, o TCLE passa a ser indispensável.

**Recomendações:**

Prestar esclarecimento ao CEP se o projeto é retrospectivo e prospectivo. Enviar relatórios semestralmente sobre o desenvolvimento do projeto e no final o relatório final juntamente com os resultados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Esclarecer no projeto a diferença entre a fase retrospectiva e prospectiva.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

parecer aprovado.

GOIANIA, 16 de Junho de 2015

---

Assinado por:

Elismauro Francisco de Mendonça  
(Coordenador)

Endereço: 238

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO

CEP: 74.605-070

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepaccg@accg.org.br

Plataforma Brasil

## 10.1 Apêndice A - Aspectos clínicos patológicos do melanoma

**IDENTIFICAÇÃO**

Prontuário: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_  
 Número da biópsia: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_  
 Gênero: ( ) Masculino ( ) Feminino  
 Data do diagnóstico: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Localização: ( ) Cabeça ( ) Tronco ( ) Membros ( ) Pés/Mãos ( ) Biópsia  
 ( ) Resseção Cirúrgica  
 História Familiar de Melanoma: (0) Não (1) Sim

**CARACTERÍSTICAS TUMORAIS:**

Tipo Histológico

( ) Extensivo superficial ( ) Nodular ( ) Lentigo Maligno ( ) Acral/Mucosa  
 ( ) Inclassificável

**Comprometimento de Margens:**

1 – Sim  
 2 – Não  
 3 – Não consta

**Ulceração Presentes:**

1 – Sim  
 2 – Não  
 3 – Não consta

**Satélites Microscópios Metástases:**

1 - Sim  
 2 - Não  
 3- Não consta

**Espessura do tumor – Breslow:**

1. In situ  
 2. ≤ 1.0 mm  
 3. 1.01 a 2.0 mm  
 4. 2.01 a 4.0 mm  
 5. > 4.0 mm

Estadiamento TNM: \_\_\_\_\_

**Sinais de Regressão:**

1 – Sim  
 2 – Não  
 3 – Não consta

**Infiltração Linfocitária Peritumoral**

1 – Sim  
 2 – Não  
 3 – Não consta

**Índice Mitótico:**

1- Sim  
 2- Não  
 3- Não consta

**Nível de Clark**

1. I  
 2. II  
 3. III  
 4. IV  
 5. V

Tratamento: (1) Cirúrgico  
 (2) Quimioterapia  
 (3) Imunoterapia  
 (4) Radioterapia  
 (5) Crioterapia

**SEGUIMENTO DO PACIENTE**

( ) – Óbito  
 ( ) – Vivo, com evidência de recidiva  
 ( ) – Vivo, sem evidência da doença  
 Intervalo Livre de Doença: \_\_\_\_\_  
 Dados coletados em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data do óbito \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Data de recidiva: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Data do último controle: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Sobrevida: \_\_\_\_\_  
 por: \_\_\_\_\_

## 10.2 Apêndice B - Ficha de avaliação imunohistoquímica

**Ficha de avaliação imunohistoquímica - Projeto: Análise dos fatores epidemiológicos, clínico-patológicos e expressão das proteínas OCT4 e NANOG em amostras de melanoma cutâneo.**

Nº biópsia:\_\_\_\_\_ Nº amostra:\_\_\_\_\_

**Análise descritiva da marcação de:**

☐ OCT4

☐ NANOG

☐ focal ☐ difusa

**Análise quantitativa da marcação:**

☐ coloração nuclear células marcadas \_\_\_\_\_

**Intensidade da coloração:**

☐ 1-negativo

☐ 2- fraca

☐ 3- moderada

☐ 4- forte

☐ 5- muito forte

☐ 0: 0%

☐ 1: 1 - 10%

☐ 2: 11 - 20%

☐ 3: 31 - 40%

☐ 4: 41 - 50%

☐ 5: 51- acima

☐ coloração citoplasmática células marcadas \_\_\_\_\_

**Intensidade da coloração:**

☐ 1-negativo

☐ 2- fraca

☐ 3- moderada

☐ 4- forte

☐ 5- muito forte

☐ 0: 0%

☐ 1: 1 - 10%

☐ 2: 11 - 20%

☐ 3: 31 - 40%

☐ 4: 41 - 50%

☐ 5: 51- acima

Observação:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_