

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E  
QUIMIOCINAS, DOS AGREGADOS DE PLAQUETAS-  
LEUCÓCITOS E DOS MEDIADORES SOLÚVEIS  
sCD40L E sCD62P NO MELANOMA CUTÂNEO**

**ROGERIO LUIZ DOS SANTOS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Interinstitucional em Oncologia da Fundação  
Antônio Prudente em parceria com o Hospital de  
Câncer de Pernambuco, para obtenção do título de  
Doutor em Ciências  
Área de Concentração em Oncologia**

**Orientador: Dr. João Pedreira Duprat Neto**

**Coorientadora: Dra. Leuridan Cavalcante Torres**

**São Paulo**

**2019**

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente**

Santos, Rogério Luiz dos

**Análise da expressão de citocinas e quimiocinas, dos agregados de plaquetas-leucócitos e dos mediadores solúveis sCD40L e sCD62P no melanoma cutâneo** / Rogério Luiz dos Santos. São Paulo, 2019

110p.

Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: João Pedreira Duprat Neto

Descritores: 1. Melanoma/Melanoma, 2. Citocinas/Cytokines, 3. Quimiocinas/Chemokines, 4. Agregação Plaquetária/Platelet Aggregation, 5. P-selectina/P-Selectin, 6. Ligante de CD40/CD40 Ligand

*“In an infinite universe,  
every point can be regarded as the center,  
because every point has an infinite number of stars on each side of it.”*

**Stephen Hawking, A Brief History of Time**

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Aristides e Marlene**, extraordinários em tudo, meus exemplos desde sempre.

À minha esposa, **Candice**, amor da minha vida e cúmplice da minha felicidade.

Às minhas filhas, **Amanda, Beatriz e Fernanda**, por iluminarem todos os meus dias.

Aos meus irmãos, **Glauco e Renata**, meus maiores amigos, meus irmãos de sangue e de alma.

## AGRADECIMENTOS

**Aos pacientes** envolvidos no estudo, pela generosidade em participarem deste projeto;

Ao Professor **João Pedreira Duprat Neto**, meu orientador, pelos ensinamentos e suporte durante esta caminhada;

À Professora **Leuridan Cavalcante Torres**, minha coorientadora, pelo compromisso profundo com a ciência e por sua determinação incansável;

Ao Professor **Fernando Augusto Soares**, pela habilidade em disseminar conhecimento e pelo seu empenho na geração deste Dinter;

Ao Professor **José Iran Costa Júnior**, pela sua imensa capacidade de exercer múltiplas tarefas com persistência e tenacidade, como se cada uma delas fosse sua única função;

Ao amigo **Mário Rino Martins**, pela iniciativa deste projeto e tantos outros, pelo encorajamento nos momentos de desânimo e pelo cuidado dedicado a todos os meus pacientes sempre que estive ausente;

Ao amigo **Thales Paulo Batista**, pela simplicidade em explicar aspectos singulares no domínio acadêmico e pela dedicação a pesquisa;

À **Direção Geral do Hospital de Câncer de Pernambuco e do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira**, pelo apoio ao projeto de pesquisa e pelo suporte à sua realização;

À **equipe do Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira**, pela naturalidade com que realizam seu trabalho, teria sido impossível sem vocês;

**Aos médicos e funcionários** do Departamento de Cirurgia Oncológica do Hospital de Câncer de Pernambuco, todos e cada um, em suas atribuições, colaboraram para que eu pudesse seguir em frente;

Ao coordenador do Serviço de Cirurgia Oncológica do Hospital de Câncer de Pernambuco, **Dr. João Alberto Barros**, pelo apoio incondicional a este projeto mesmo diante da demanda crescente do Serviço;

**Aos residentes** de cirurgia oncológica do Hospital de Câncer de Pernambuco, pela assistência diária e cuidado com os pacientes;

Aos anesthesiologistas **Dr. Aumério Chagas e Dr. Lucas Lima**, pela sua competência e dedicação que tornam o cotidiano muito mais fácil;

Ao Dr. **Sérgio Ricardo Soares de Moura** e a todos da equipe do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital de Câncer de Pernambuco, pelo coleguismo e gentileza ao aceitar mais esta tarefa;

Às enfermeiras **Valéria Lúcia de Melo e Italaney Silva**, pela paciência e esmero com planilhas intermináveis;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

## RESUMO

Santos RL. **Análise da expressão de citocinas e quimiocinas, dos agregados de plaquetas-leucócitos e dos mediadores solúveis sCD40L e sCD62P no melanoma cutâneo.** São Paulo, 2019. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco].

**Introdução:** O melanoma cutâneo é uma neoplasia maligna dos melanócitos da pele com incidência variável no mundo e o prognóstico é desfavorável nos estágios mais avançados. O desenvolvimento do melanoma está associado ao sistema imunológico e a maior evolução no seu tratamento se deu a partir de medicamentos baseados no estímulo da resposta imune contra o tumor. **Objetivo:** Avaliar a expressão de citocinas e quimiocinas, dos agregados de plaquetas-leucócitos e de mediadores solúveis sCD40L e sCD62P no sangue de pacientes com melanoma cutâneo. **Métodos:** Foi realizado um estudo transversal em pacientes com melanoma cutâneo admitidos para tratamento cirúrgico no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), entre os anos de 2015 e 2018. Foram incluídos 51 pacientes (média de 57,6 anos) com diagnóstico de melanoma cutâneo, e como grupo controle, 30 indivíduos saudáveis (média de 56,7 anos). As coletas de sangue foram realizadas antes da ressecção do melanoma. A determinação dos níveis de citocinas IL6, IL10, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL12p70 e das quimiocinas CXCL10 (IP10), CCL2 (MCP-1), CXCL9 (MIG), CCL5 (RANTES) e CXCL8 (IL8), sCD40L e sCD62P, e agregados plaquetas-leucócitos foi realizada por citometria de fluxo. Foram realizadas análises entre os grupos de pacientes e controles, e pelos parâmetros como tipo histológico, estadió, espessura de Breslow e presença de metástases linfonodais. O teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para comparação entre dois grupos, e de *Kruskal-Wallis* para as análises entre três ou mais grupos. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . **Resultados:** Não houve detecção de IL1 $\beta$  e IL12 no sangue dos pacientes e controles. Verificou-se níveis elevados das citocinas IL10 e diminuídos de TNF $\alpha$  nos pacientes comparados ao grupo controle, ( $p < 0,0001$ ). A IL6 esteve aumentada nos pacientes com estadió II em relação ao III ( $p = 0,017$ ) e em

pacientes com linfonodos negativos ( $p < 0,0001$ ). Foram encontrados níveis reduzidos da quimiocina CCL5 ( $p = 0,009$ ) nos pacientes quando comparados ao grupo controle. O percentual de agregação plaquetária em linfócitos, monócitos e neutrófilos também foi elevado nos pacientes comparado ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ,  $p = 0,009$  e  $p < 0,0001$  respectivamente). Foram encontrados níveis elevados de agregados plaquetas-monócitos nos pacientes com linfonodos positivos ( $p = 0,008$ ). Os níveis solúveis sCD40L e sCD62P foram elevados nos pacientes comparados aos controles ( $p = 0,03$  e  $p = 0,006$ , respectivamente). **Conclusão:** Os dados obtidos das análises realizadas mostram que os pacientes com melanoma cutâneo apresentam um perfil imunossupressor com a participação de plaquetas e monócitos/macrófagos que favorecem a progressão tumoral.

**Descritores:** Melanoma, Citocinas, Quimiocinas, Agregação Plaquetária, P-selectina, Ligante de CD40

## SUMMARY

Santos RL. [Analysis of the expression of cytokines and chemokines, platelet-leukocyte aggregates and soluble mediators sCD40L and sCD62P in cutaneous melanoma]. São Paulo, 2019. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco].

Cutaneous melanoma is a malignancy originated from the skin melanocytes, with a variable incidence worldwide and a poor prognosis in advanced stages. Melanoma growth is closely associated with the immune system and the most important treatment advances resulted from stimulation of immune response against the tumor. **Objective:** To evaluate the expression of cytokines and chemokines, platelet-leukocyte aggregates and soluble mediators sCD40L and sCD62P in the blood of patients with cutaneous melanoma. **Methods:** A cross-sectional study was performed in cutaneous melanoma patients admitted for surgical treatment at the Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) between 2015 and 2018. Fifty-one patients (mean age 57.6 years) with a diagnosis of melanoma were included, and 30 healthy individuals (mean age 56.7 years) were chosen as the control group. The blood samples were taken before resection of the melanoma. The determination of cytokines IL6, IL10, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  and IL12p70 and chemokines CXCL10 (IP10), CCL2 (MCP-1), CXCL9 (MIG), CCL5 (RANTES) and CXCL8 (IL8), sCD40L and sCD62P, and platelet-leukocyte aggregate was performed by flow cytometry. Analysis were performed between patient and control groups, and by parameters such as histological type, stage, Breslow thickness, and presence of lymph node metastases. Mann-Whitney test was used for comparison between the two groups, and Kruskal-Wallis test for analysis between three or more groups. It was considered significant  $p < 0.05$ . **Results:** There was no detection of IL1 $\beta$  and IL12 in the blood of patients and controls. Elevated levels of IL10 and decreased TNF $\alpha$  cytokines were found in patients compared to the control group ( $p < 0.0001$ ). IL6 was increased in patients with stage II compared to III ( $p = 0.017$ ) and in patients with negative lymph nodes ( $p < 0.0001$ ). Reduced CCL5 chemokine levels ( $p = 0.009$ )

were found in patients compared to the control group. The percentage of platelet aggregation in lymphocytes, monocytes and neutrophils was also high in patients when compared to the control group ( $p < 0.05$ ). High levels of platelet-monocyte aggregates were found in patients with positive lymph nodes ( $p=0.008$ ). Soluble sCD40L and sCD62P levels were elevated in patients compared to controls ( $p=0.03$  and  $p=0.006$ , respectively). **Conclusion:** The data obtained from the analysis performed show that patients with cutaneous melanoma have an immunosuppressive profile with platelet participation and monocytes/macrophages that favor tumor progression.

**Key-words:** Melanoma, Cytokines, Chemokines, Platelet Aggregation, P-Selectin, CD40 Ligand

## LISTA DE FIGURAS, QUADRO E TABELA

<b>Figura 1</b>	Incidência mundial de melanoma no ano de 2018 por 100.000 habitantes em comparação com outras neoplasias.....	3
<b>Figura 2</b>	Incidência de melanoma em homens e mulheres em Pernambuco, dividido por Estado e capital .....	3
<b>Figura 3</b>	As características fisiopatológicas do melanoma .....	5
<b>Figura 4</b>	Regra do ABCDE para detecção do melanoma cutâneo .....	7
<b>Figura 5</b>	Profundidade do melanoma na pele em milímetros (Breslow) e os níveis de Clark (medidos pela camada da derme acometida pelo melanoma). .....	8
<b>Figura 6</b>	Tipos principais de melanoma .....	10
<b>Figura 7</b>	Funções das células imunes inatas nos tumores metastáticos.....	22
<b>Figura 8</b>	O papel da sinalização de CXCL8 (IL8) no microambiente tumoral .	25
<b>Figura 9</b>	O papel da sinalização de CCL2/MCP1 no microambiente tumoral ..	25

<b>Figura 10</b>	O papel das plaquetas na resposta imune .....	33
<b>Figura 11</b>	Visão esquemática da cascata metastática (foco em plaqueta).....	34
<b>Figura 12</b>	Ativação e migração das células tronco melanocíticas (melanocytic stem cells - MSC) em resposta à exposição à radiação UVB com início do melanoma cutâneo .....	36
<b>Figura 13</b>	Técnica de CBA para detecção de TNFRI e TNFRII.....	47
<b>Figura 14</b>	Visão geral da imunofenotipagem por citometria de fluxo .....	49
<b>Figura 15</b>	Imagens ilustrativas dos agregados de plaquetas-leucócitos .....	50
<b>Figura 16</b>	Níveis de citocinas IL6, TNF $\alpha$ e IL10 (pg/mL) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo e controles .....	56
<b>Figura 17</b>	Níveis de citocinas IL6, TNF $\alpha$ e IL10 (pg/mL) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo dos tipos melanoma disseminativo superficial (MDS), melanoma nodular (MN), melanoma acral lentiginoso (AL) e controles.....	56
<b>Figura 18</b>	Níveis de citocinas IL6, TNF $\alpha$ e IL10 (pg/mL) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo em estádios I, II e III da doença	57

<b>Figura 19</b>	Níveis de citocinas IL6, TNF $\alpha$ e IL10 (pg/mL) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo com Breslow $\leq 4$ mm ou $> 4$ mm	58
<b>Figura 20</b>	Níveis de citocinas IL6, TNF $\alpha$ e IL10 (pg/mL) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo e linfonodos positivos (LN+) e negativos (LN-).....	59
<b>Figura 21</b>	Níveis (pg/mL) de IP10/CXCL10, MIG/CXCL9, IL8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo e controles.....	61
<b>Figura 22</b>	Níveis (pg/mL) de IP10/CXCL10, MIG/CXCL9, IL8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo dos tipos melanoma disseminativo superficial (MDS), melanoma nodular (MN), melanoma acral lentiginoso (AL) e controles.....	62
<b>Figura 23</b>	Níveis de quimiocinas de acordo com o tipo de melanoma .....	63
<b>Figura 23</b>	Níveis (pg/mL) de IP10/CXCL10, MIG/CXCL9, IL8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo em estadio I, II e III da doença .....	64
<b>Figura 24</b>	Níveis (pg/mL) de IP10/CXCL10, MIG/CXCL9, IL8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo com Breslow $\leq 4$ mm ou $> 4$ mm .....	64

- Figura 25** Níveis (pg/mL) de IP10/CXCL10, MIG/CXCL9, IL8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 no sangue periférico de pacientes com melanoma cutâneo e linfonodos positivos (LN+) e negativos (LN-) .. 65
- Figura 26** Níveis percentuais dos agregados plaquetas-linfócitos (AGP-Linfócitos), plaquetas-monócitos (AGP-Monócitos) e plaquetas-neutrófilos (AGP-Neutrófilos) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo e controles..... 67
- Figura 27** Níveis percentuais dos agregados plaquetas-linfócitos (AGP-Linfócitos), plaquetas-monócitos (AGP-Monócitos) e plaquetas-neutrófilos (AGP-Neutrófilos) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo dos tipos, melanoma disseminativo superficial (MDS), melanoma nodular (MN), melanoma acral lentiginoso (MAL) e de controles..... 68
- Figura 28** Níveis percentuais dos agregados plaquetas-linfócitos (AGP-Linfócitos), plaquetas-monócitos (AGP-Monócitos) e plaquetas-neutrófilos (AGP-Neutrófilos) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo estratificados por estádios I, II e III ..... 69
- Figura 29** Níveis percentuais dos agregados plaquetas-linfócitos (AGP-Linfócitos), plaquetas-monócitos (AGP-Monócitos) e plaquetas-neutrófilos (AGP-Neutrófilos) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo e com espessuras de Breslow  $\leq 4\text{mm}$  ou  $> 4\text{mm}$  ..... 70

<b>Figura 30</b>	Níveis percentuais dos agregados plaquetas-linfócitos (AGP-Linfócitos), plaquetas-monócitos (AGP-Monócitos) e plaquetas-neutrófilos (AGP-Neutrófilos) no sangue de pacientes com melanoma cutâneo e linfonodos positivos (LN+) e negativos (LN-). .....	71
<b>Figura 31</b>	Níveis solúveis (pg/mL) de sCD40L e sCD62P no sangue periférico dos pacientes com melanoma e dos controles .....	73
<b>Figura 32</b>	Níveis solúveis (pg/mL) de sCD40L e sCD62P no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo estratificados por estadios I, II e III .....	74
<b>Figura 33</b>	Níveis solúveis (pg/mL) de sCD40L e sCD62P no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo e com espessuras de Breslow $\leq$ 4mm ou $>$ 4mm.....	75
<b>Figura 34</b>	Níveis solúveis (pg/mL) de sCD40L e sCD62P no sangue de pacientes com melanoma cutâneo e linfonodos positivos (LN+) e negativos (LN-). .....	75
<b>Quadro 1</b>	Definição e categorização das variáveis clínicas e patológicas.....	44
<b>Tabela 1</b>	Distribuição das frequências das características clínicas e histopatológicas de 51 pacientes com melanoma cutâneo atendidos no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) .....	54

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>AGP</b>	Agregados plaquetários
<b>AJCC</b>	do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>APC</b>	do inglês, <i>Antigen-presenting cells</i>
<b>ARID2</b>	do inglês, <i>AT-rich interaction domain 2</i>
<b>BCL2</b>	do inglês, <i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
<b>bFGF</b>	do inglês, <i>Basic fibroblast growth factor</i>
<b>BRAF</b>	do inglês, <i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
<b>CBA</b>	do inglês, <i>Cytometric bead array</i>
<b>CD</b>	do inglês, <i>Cluster of differentiation</i>
<b>CD62p</b>	P-selectina
<b>CDK4</b>	do inglês, <i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
<b>CDKN2A</b>	do inglês, <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2 A</i>
<b>CLEC-2</b>	do inglês, <i>C-type lectin-like receptor 2</i>
<b>CTLA-4</b>	do inglês, <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4.</i>
<b>DAMPs</b>	do inglês, <i>Damage-associated molecular pattern</i>
<b>DC</b>	do inglês, <i>Dendritic cells</i>
<b>DNA</b>	do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>EDTA</b>	do inglês, <i>Ethyle diamine tetraacetic acid</i>
<b>EGF</b>	do inglês, <i>Epidermal growth factor</i>
<b>FAMMM</b>	do inglês, <i>Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome</i>
<b>GP</b>	Glicoproteína
<b>HCP</b>	Hospital de Câncer de Pernambuco
<b>HMGB1</b>	do inglês, <i>High mobility group box 1</i>
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMIP</b>	Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira
<b>INCA</b>	Instituto Nacional de Câncer
<b>MAL</b>	Melanoma acral lentiginoso

<b>MAPK</b>	do inglês, <i>Mitogen-activated protein kinase</i> .
<b>MAP2K1</b>	do inglês, <i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
<b>MAS</b>	do inglês, <i>Melanoma-Astrocytoma Syndrome</i>
<b>MC1R</b>	do inglês, <i>Melanocortin 1 receptor</i>
<b>MCP1</b>	do inglês, <i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
<b>MSC</b>	do inglês, <i>Melanocytic stem cell</i>
<b>MDSC</b>	do inglês, <i>Mieloid derived supressor cells</i> .
<b>MEK</b>	do inglês, <i>MAP-ERK kinase</i>
<b>MDS</b>	Melanoma disseminativo superficial
<b>MHC I/II</b>	do inglês, <i>Major histocompatibility complex class I e II</i>
<b>MIG</b>	do inglês, <i>Monokine induced by gamma interferon</i>
<b>MMP</b>	Metaloproteinase
<b>MN</b>	Melanoma nodular
<b>MSF</b>	do inglês, <i>Melanocyte-stimulating factor</i>
<b>NCI</b>	do inglês, <i>National Cancer Institute</i>
<b>NF-1</b>	do inglês, <i>Neurofibromin 1</i>
<b>NHGRI</b>	do inglês, <i>National Human Genome Research Institute</i>
<b>NK</b>	do inglês, <i>Natural killer</i>
<b>NRAS</b>	do inglês, <i>NRAS proto-oncogene, GTPase</i>
<b>PAF</b>	do inglês, <i>Platelet-activating factor</i>
<b>PAMPs</b>	do inglês, <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
<b>PD1</b>	do inglês, <i>Programmed cell death protein 1</i>
<b>PDGF</b>	do inglês, <i>Platelet derived growth factor</i>
<b>PPP6C</b>	do inglês, <i>Protein phosphatase 6 catalytic subunit</i>
<b>PTEN</b>	do inglês, <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
<b>RANTES</b>	do inglês, <i>Regulated upon activation, normally T-expressed, and presumably secreted</i>
<b>TAMs</b>	do inglês, <i>Tumor-associated macrophages</i>
<b>TCD4<sup>+</sup></b>	Linfócito T CD4 positivo
<b>TCD8<sup>+</sup></b>	Linfócito T CD8 positivo
<b>TCGA</b>	do inglês, <i>The Cancer Genoma Atlas</i>
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido

<b>TC-99m</b>	Tecnécio 99 marcado
<b>TGFβ</b>	do inglês, <i>Transforming growth factor beta</i>
<b>TH</b>	do inglês, <i>T helper</i>
<b>TLR</b>	do inglês, <i>Toll like receptor</i>
<b>TNF</b>	do inglês, <i>Tumor necrosis factor</i>
<b>TP53</b>	do inglês, <i>Tumor protein p53</i>
<b>Treg</b>	do inglês, <i>Regulatory T-cells</i>
<b>TXA2</b>	Tromboxane A2
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VEGF</b>	do inglês, <i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>vWf</b>	Fator de von Willebrand

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
1.1	Melanoma Cutâneo .....	2
1.1.1	Epidemiologia .....	2
1.1.2	Fisiopatologia.....	4
1.1.3	Aspectos Clínicos e Diagnóstico.....	5
1.1.4	Tipos histológicos de Melanoma Cutâneo Invasivo .....	8
1.2	Fatores de Risco no Melanoma Cutâneo.....	10
1.2.1	Fatores Ambientais .....	10
1.2.2	Fatores não Ambientais.....	12
1.3	Classificação Molecular do Melanoma.....	13
1.4	Tratamento do Melanoma Cutâneo.....	15
1.5	Sistema Imune e Câncer.....	18
1.5.1	Imunidade inata.....	19
1.5.2	Imunidade adaptativa .....	26
1.6	Plaquetas, Sistema Imune e Metástases Tumorais.....	29
1.7	Inflamação e Imunovigilância no Melanoma.....	34
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
2.1	Objetivo Geral.....	40
2.2	Objetivos Específicos.....	40
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
3.1	Detalhamento do Estudo .....	42
3.2	Critérios de Elegibilidade .....	42
3.3	População do Estudo.....	43
3.4	Definição dos Termos e Variáveis clínicas e patológicas.....	43
3.4.1	Classificação, definição operacional e categorização das variáveis .....	43
3.5	Procedimentos para coleta dos dados clínicos e histopatológicos .....	45
3.6	Testes laboratoriais .....	46

3.6.1	Coleta de sangue e preparação das amostras .....	46
3.6.2	Determinação dos níveis de proteínas livres no plasma por Cytometric Bead Array (CBA) .....	46
3.7	Análise estatística.....	51
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
4.1	Descrição das características clínicas dos pacientes.....	53
4.2	Análises das citocinas IL6, TNF $\alpha$ , IL10, IL1 $\beta$ e IL12 no sangue periférico	55
4.3	Análises das quimiocinas IP10/CXCL10, MCP-1/CCL2, MIG/CXCL9, RANTE/CCL5 e de IL8/CXCL8 .....	60
4.4	Análises dos agregados plaquetas-linfócitos, plaquetas-monócitos e plaquetas-neutrófilos.....	66
4.5	Análises dos níveis solúveis de CD40L (sCD40L) e sCD62P (P-selectina) .	71
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>91</b>

## APÊNDICES

**Apêndice 1** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Apêndice 2** Questionário padrão / ficha clínica

**Apêndice 3** Artigo publicado em 2018

**Apêndice 4** Artigo publicado em 2019

## ANEXOS

**Anexo 1** Comprovante de aprovação pelo CEP do HCP

**Anexo 2** TNM pela AJCC



**1**

# INTRODUÇÃO

# 1 INTRODUÇÃO

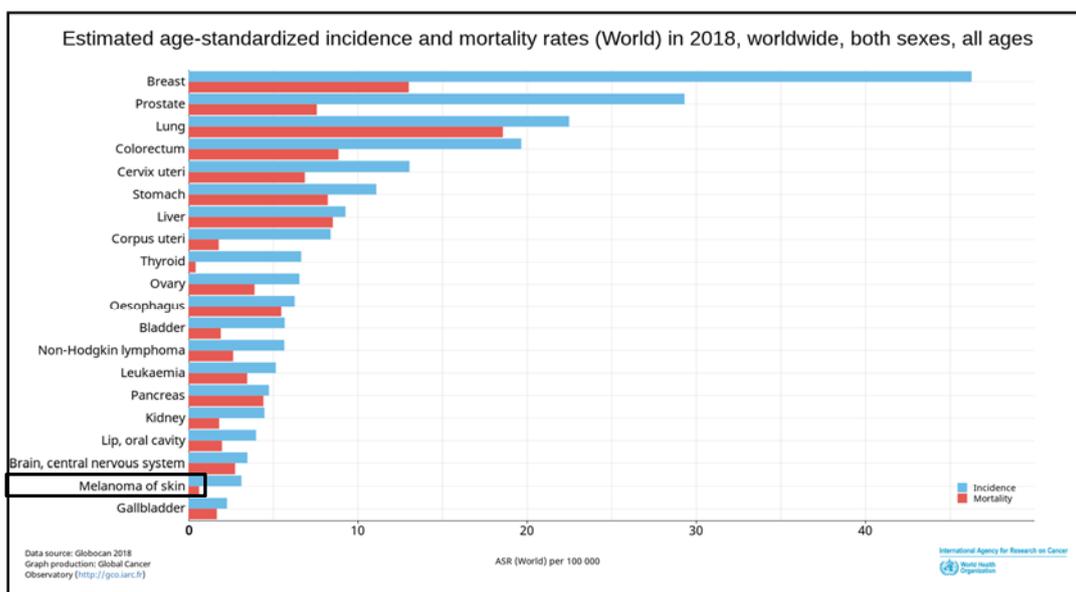
## 1.1 MELANOMA CUTÂNEO

### 1.1.1 Epidemiologia

O melanoma cutâneo é uma das formas mais agressivas de câncer de pele e uma das principais causas de mortalidade por câncer devido ao elevado risco de metástases (ELDER 2015). A incidência de melanoma cutâneo varia muito entre os países e esses diferentes padrões de incidência são atribuídos às diferenças étnicas e de exposição solar. Em 2018, a estimativa de incidência global do melanoma cutâneo foi de 287.723 casos novos (3,1/100.000 habitantes) com 60.712 óbitos. A Austrália e Nova Zelândia são os países com as maiores incidências de melanoma no mundo, com 33,6 e 33,3 casos novos por 100.000 habitantes, respectivamente. Na América Latina, foram estimados 18.212 casos novos, com 5.287 mortes para 2018, sendo uma incidência de 2,4/100.000 habitantes. Os países asiáticos têm as incidências mais baixas de melanoma cutâneo (0,41/100.000 habitantes) (International Agency for Research on Cancer-IARC 2019) (Figura 1).

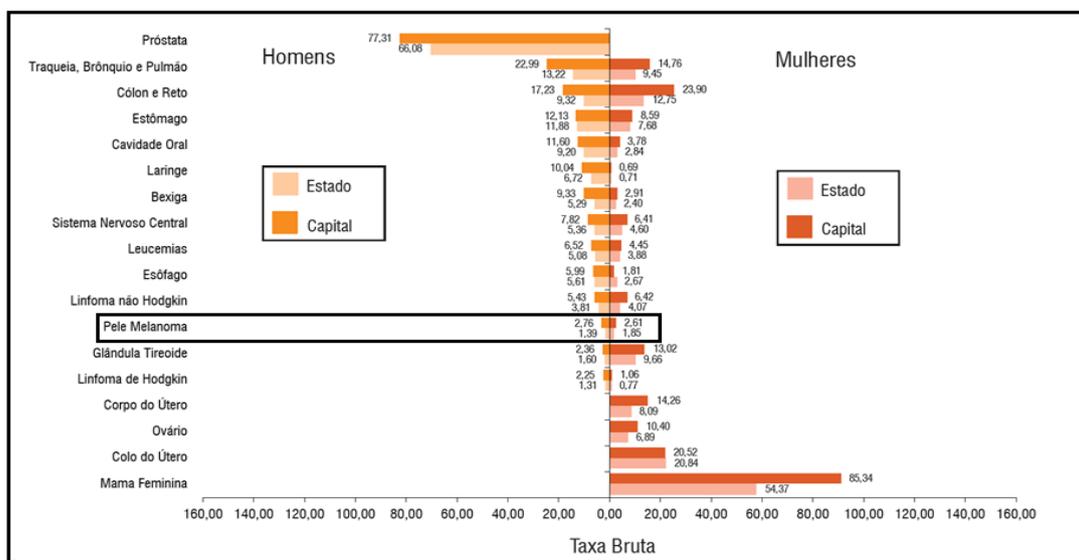
No Brasil, a estimativa de casos novos de melanoma em 2018 foi de 6.260 (Ministério da Saúde 2018). No Nordeste, a incidência estimada foi de 730 casos. Em Pernambuco, foram esperados 150 casos novos de melanoma para 2018, o que corresponde a 1,39/100.000 habitantes para o sexo masculino e 1,85/100.000 habitantes para o sexo feminino. Para a capital, Recife, foram esperados 40 casos

novos, representando 2,76/100.000 habitantes para o sexo masculino e 2,61/100.000 habitantes para o feminino (Ministério da Saúde 2018) (Figura 2).



Fonte: IARC (2019).

**Figura 1** - Incidência mundial de melanoma no ano de 2018 por 100.000 habitantes em comparação com outras neoplasias.



Fonte: Ministério da Saúde (2018).

**Figura 2** – Incidência de melanoma em homens e mulheres em Pernambuco, dividido por Estado e capital.

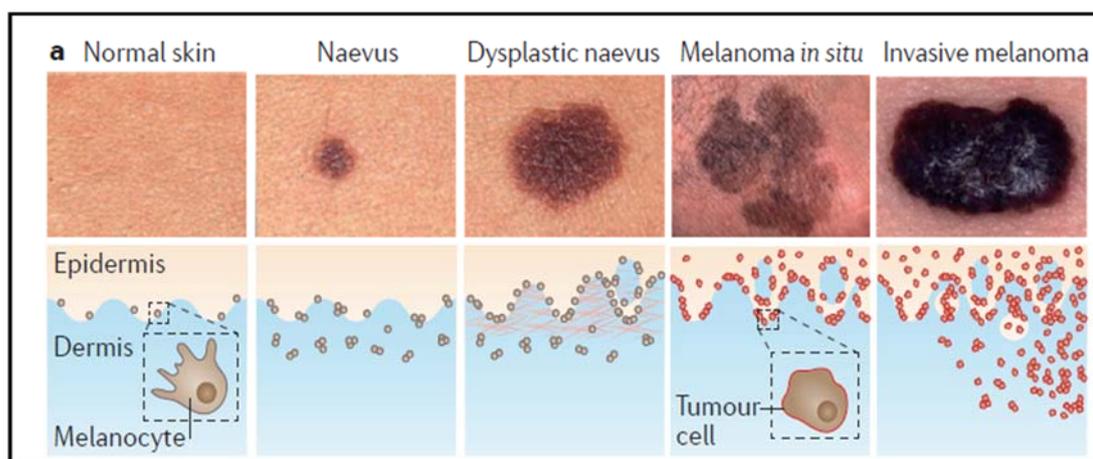
### 1.1.2 Fisiopatologia

As neoplasias melanocíticas variam de lesões benignas, denominadas nevus (naevus) melanocíticos, para malignas, denominadas melanomas. Todas se originam dos melanócitos, que são células derivadas da crista neural e que, durante o desenvolvimento, colonizam a pele, os olhos e, em menor grau outros tecidos. Existem cerca de 1.500 melanócitos por milímetro quadrado de epiderme humana, correspondendo a quase 3 bilhões de melanócitos cutâneos na pele do indivíduo adulto. As células névicas diferem dos melanócitos usuais pela ausência de processos dendríticos e por se apresentarem agrupadas na epiderme basal e/ou na derme, enquanto os melanócitos epidérmicos são dispersos aleatoriamente como unidades isoladas. As lesões pigmentadas oriundas das células névicas são denominadas nevus (JIMBOW et al. 1975; COSTIN e HEARING 2007; HUNT et al. 2019).

Os melanócitos representam uma população celular minoritária dentro da epiderme basilar e se dividem com pouca frequência - menos de duas vezes por ano. Sua principal função é fornecer um pigmento, chamado de melanina, aos queratinócitos (JIMBOW et al. 1975; COSTIN e HEARING 2007; ELDER 2015). A melanina é uma macromolécula complexa que dispersa e absorve a radiação ultravioleta (UV) solar, e os queratinócitos da epiderme a utilizam para proteger seu núcleo dos danos ao DNA induzidos pela radiação UV (PICARDO e SLOMINSKI 2017).

Os melanomas primários são frequentemente encontrados em associação com diferentes tipos de lesões precursoras, variando de nevus benigno e nevus displásico a melanoma *in situ*. Os modelos de progressão idealizados frequentemente implicam em um único caminho de evolução desde o nevus (lesão benigna), nevus displásico,

melanoma *in situ* e melanoma invasivo. No entanto, a situação é mais complexa, pois existem múltiplos tipos de melanoma, que podem estar ligados a diferentes lesões precursoras (MORT et al. 2015) (Figura 3).



Fonte: SHAIN e BASTIAN (2016)

**Figura 3** - As características fisiopatológicas do melanoma. Imagens clínicas mostrando uma lesão benigna (naevus), lesão displásica (Dysplastic naevus), melanoma *in situ* e melanoma invasivo. Esquemas que ilustram as características histológicas de cada tipo de lesão.

### 1.1.3 Aspectos clínicos e diagnóstico

O melanoma cutâneo é frequentemente associado a uma lesão pigmentada de bordos irregulares, contudo, estas características podem não estar presentes nas lesões precoces. Para estas lesões, a suspeita do diagnóstico pode ser decorrente de modificação de lesões pigmentadas existentes ou do aparecimento de novas lesões. Existem métodos clínicos, desenvolvidos para auxiliar no reconhecimento precoce de lesões que tenham recomendação para biópsia. Os dois métodos mais utilizados são o sinal do patinho feio e a regra do ABCDE (SCOPE et al. 2008).

O sinal do patinho feio consiste no reconhecimento de uma lesão que seja diferente das demais lesões que o paciente apresente (SCOPE et al. 2008). A regra

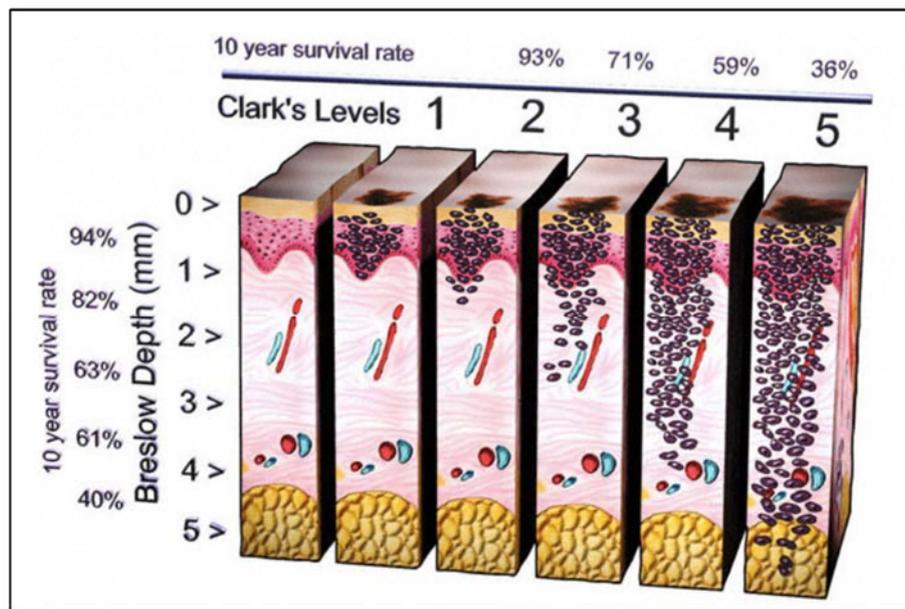
mnemônica do ABCDE é derivada do acrônimo no qual A representa assimetria da lesão pigmentada, B representa bordas irregulares da lesão, C representa múltiplas cores ou múltiplos tons, D representa diâmetro maior do que 6mm e E a evolução rápida da lesão. O diagnóstico precoce da neoplasia é essencial para obtenção de melhores resultados em sobrevida, pois melanomas iniciais tratados adequadamente tem altas taxas de cura (BRADY et al. 2000). A avaliação das lesões suspeitas por profissionais treinados garante um diagnóstico mais preciso, além de programas de orientação e conscientização da população (GACHON et al. 2005). Alguns métodos diagnósticos auxiliares, como a dermatoscopia (exame não invasivo realizado com a utilização de um aparelho - dermatoscópio), permitem uma visualização mais detalhada das lesões pigmentadas, incrementam a acurácia do diagnóstico clínico e aumentam as taxas de diagnóstico de lesões em estádios iniciais (VESTERGAARD et al. 2008) (Figura 4).



Fonte: Skin Cancer Foundation (2019)

**Figura 4** - Regra do ABCDE para detecção do melanoma cutâneo.

A biópsia de uma lesão suspeita é necessária para o diagnóstico e estadiamento. A melhor forma de realizar a biópsia é através da exérese de toda lesão com uma margem de no máximo 3 mm (MARS DEN et al. 2010). A profundidade do melanoma medida em milímetros é o principal fator prognóstico da doença e é obtida através da análise histopatológica da lesão após a biópsia inicial. Descrita por Breslow em 1970, divide os melanomas em finos (com espessura menor do que 2 milímetros), melanomas de espessura intermediária (entre 2 e 4 milímetros) e espessos (acima de 4 milímetros) (Figura 5). O potencial metastático da lesão é proporcional a sua espessura na pele. Outros fatores prognósticos importantes são ulceração e presença de linfonodos comprometidos pelo tumor (GERSHENWALD et al. 2017a e b).



Fonte: Medical Digital Medical Art-MEDART (2019)

**Figura 5** - Profundidade do melanoma na pele em milímetros conforme classificação de Breslow e os níveis de Clark (medidos pela camada da derme acometida pelo melanoma).

#### 1.1.4 Tipos histológicos de melanoma cutâneo invasivo

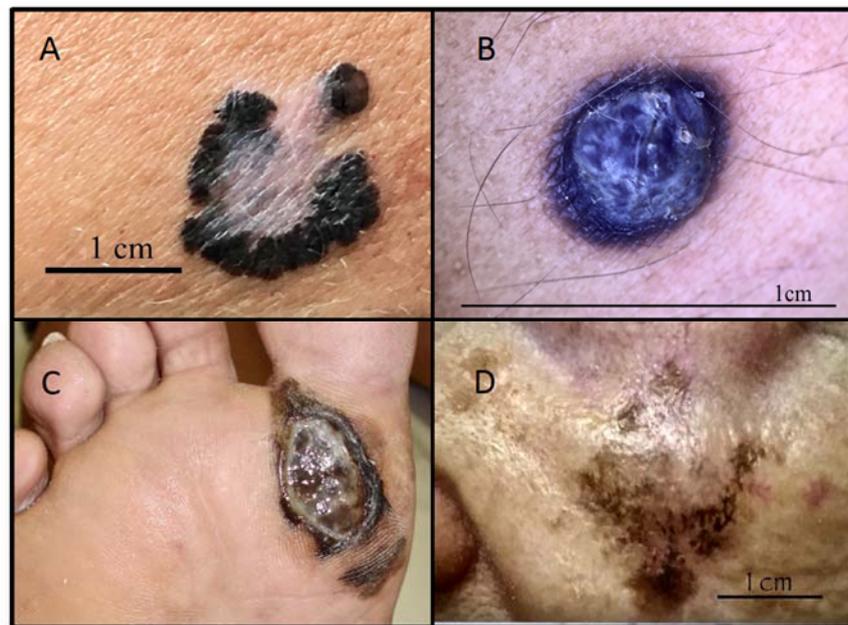
Existem quatro tipos principais de melanoma cutâneo invasivo, que são o disseminativo superficial, o nodular, o acral lentiginoso e o lentigo maligno melanoma. O tipo disseminativo superficial é o mais frequente, correspondendo a 70% dos melanomas em indivíduos caucasianos, com uma mediana de idade entre 52 e 63 anos (WU et al. 2011; WOLFF et al. 2017). Na maioria dos casos, esse tipo é diagnosticado em fases mais iniciais, por apresentar uma evolução prolongada e um crescimento inicial horizontal na epiderme (LASITHIOTAKIS et al. 2006). É o tipo mais associado ao nevus pré-existente, tendo, nos homens, uma predileção anatômica pelo dorso e nas mulheres pelas extremidades inferiores (PAMPENA et al. 2017).

O melanoma nodular é o segundo em frequência, sendo responsável por 15% dos casos e por definição, são melanomas em fase de crescimento vertical. Apresenta

a mesma distribuição anatômica do disseminativo superficial, sendo o tipo mais comum entre os asiáticos e clinicamente se apresenta como uma lesão pigmentada, pediculada ou nódulo polipóide (WOLFF et al. 2017). Cerca de 50% dos casos são diagnosticados em estadios mais avançados (DEMIERRE et al. 2005).

O melanoma acral lentiginoso representa 5 a 10% dos melanomas na população caucasiana, porém é o subtipo mais comum em afrodescendentes, correspondendo a 50 – 70% dos casos nesta população. Sua localização, em geral, é nas regiões palmares e plantares ou nas regiões subungueais dos dedos das mãos e pés. A maioria dos pacientes são diagnosticados acima dos 60 anos e em fases mais avançadas de doença, em parte, devido a localização plantar e por serem frequentemente confundidos com lesões de natureza benigna (WOLFF et al. 2017).

O lentigo maligno melanoma acomete geralmente pacientes idosos em áreas de exposição solar crônica diária, como face (principalmente) e antebraços (WOLFF et al. 2017). A sua incidência vem aumentando nos últimos anos nos Estados Unidos onde representa 4 – 15% dos casos diagnosticados (SWETTER et al. 2005). Outros subtipos mais raros incluem o melanoma amelanótico, o desmoplásico e o epitelióide (WOLFF et al. 2017) (Figura 6).



**Fonte:** arquivo pessoal. (Foto autorizada)

**Figura 6** - Tipos principais de melanoma. A) Tipo disseminativo superficial de dorso; B) Tipo nodular de coxa direita; C) Tipo acral lentiginoso de pé direito; D) Tipo lentigo maligno melanoma em face esquerda.

## 1.2 FATORES DE RISCO NO MELANOMA CUTÂNEO

### 1.2.1 Fatores ambientais

A radiação UV é o principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento do melanoma cutâneo (GILCHREST et al. 1999; PENNELLO et al. 2000; FALZONE et al. 2016). O aumento do risco de melanoma devido à exposição solar está diretamente associado ao nível de exposição UV e, em particular, ao espectro UV-B (PENNELLO et al. 2000). Além disso, os padrões e o tempo de exposição ao sol têm sido associados com elevado risco de melanoma. Em particular, a exposição solar intensa e intermitente (típica da história de queimaduras solares) está associada a um risco maior em comparação com um padrão contínuo de exposição solar (GILCHREST et al. 1999; FALZONE et al. 2016).

A história de queimaduras solares na infância e adolescência está associada ao maior risco de desenvolvimento de melanoma cutâneo, e indivíduos que apresentam mais de cinco episódios de queimaduras graves têm o risco duas vezes maior de desenvolver melanoma (GANDINI et al. 2011). A exposição regular a radiação UV proveniente de câmaras de bronzamento artificial também aumentam significativamente o risco do surgimento do melanoma cutâneo (BONIOL et al. 2012). Os mecanismos de carcinogênese dos melanócitos são complexos, porém, as radiações UV-A e UV-B desempenham um papel fundamental nas alterações genéticas encontradas frequentemente no melanoma cutâneo (HODIS et al. 2012; ALEXANDROV et al. 2013).

De fato, os melanomas causados pela exposição prolongada ao sol são comuns em indivíduos com idade acima de 55 anos, em áreas do corpo como cabeça e pescoço, no dorso e nas extremidades superiores. As principais alterações genéticas nesses indivíduos são as mutações dos proto-oncogenes *BRAF*, neurofibromina 1 (*NF1*) e de *NRAS*, que ocorrem devido a exposição crônica à radiação UV. Por outro lado, os melanomas associados aos casos de exposição intermitente à radiação UV ocorrem em indivíduos abaixo de 55 anos, em áreas do corpo menos expostas ao sol, como o tronco e extremidades proximais, e geralmente as alterações genéticas encontradas nesses casos são mutações no *BRAF*<sup>V600E</sup> (CURTIN et al 2005; BASTIAN 2014; CANDIDO et al. 2014; LEONARDI et al. 2018).

As mutações no gene *BRAF* são encontradas em até 80% dos nevus benignos, demonstrando uma alteração genética precoce e ativação na via BRAF / MEK, porém esses nevus podem permanecer indolentes por décadas (POLLOCK et al. 2003). Por sua vez, os melanomas associados à pele cronicamente exposta ao sol geralmente não

surtem de nevus preexistentes, mas de melanomas *in situ* ou lesões displásicas e carregam um conjunto de diferentes mutações (SHAIN e BASTIAN 2016).

### 1.2.2 Fatores não-ambientais

Além dos fatores ambientais, existem outros fatores de risco importantes para o desenvolvimento do melanoma, como o número de nevus melanocíticos congênitos e adquiridos, a suscetibilidade genética e a história familiar (BAUER e GARBE 2003; RUSSO et al. 2009; HAWKES et al. 2016). Aproximadamente 30% dos casos de melanoma estão associados as lesões benignas da pele, também conhecido como nevus, tendo sido demonstrado em biópsias de melanoma, a presença de células névicas remanescentes em até 40% dos casos biopsiados (BERWICK et al. 2009; PAMPENA et al. 2017).

A presença de mais de 40 nevus, principalmente no dorso, aumenta o risco para o aparecimento da doença, como também a atipia dos nevus é um indicador de risco. Os pacientes que apresentam múltiplos nevus atípicos tem seis vezes mais risco de desenvolverem melanomas (GANDINI et al. 2005). Nesse contexto, não apenas o número total de nevus, mas também o tamanho e o tipo de nevus, estão associados individualmente a um risco aumentado de melanoma (SEYKORA e ELDER 1996; WATT et al. 2004; GANDINI et al. 2005).

Em relação à suscetibilidade genética, os polimorfismos no gene do receptor de melanocortina 1 (MC1R), que são responsáveis pelos diferentes fenótipos da cor da pele humana, desempenham um papel fundamental. Indivíduos com cabelos ruivos, pele clara e olhos claros, que exibem baixa pigmentação cutânea, apresentam maior sensibilidade à radiação UV (DESSINIOTI et al. 2011). De 7 a 15% dos casos de

melanoma ocorrem em indivíduos com histórico familiar (GOLDSTEIN e TUCKER 2001).

No entanto, o verdadeiro melanoma hereditário, com múltiplas lesões primárias e início precoce da doença, é pouco frequente. Nos últimos anos, verificou-se que os melanomas surgem em famílias que são propensas a padrões específicos de malignidades, como a Síndrome dos Nevus Atípicos Múltiplos do Melanoma Familiar (*Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome - FAMMM*), e a síndrome melanoma-astrocitoma (*Melanoma-Astrocytoma Syndrome - MAS*). Também foram identificadas famílias com mutações germinativas nos genes *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A) e *cyclin-dependent kinase 4* (CDK4) (GRUIS et al. 1995; ZUO et al. 1996; SOURA et al. 2016). Outras condições hereditárias associadas a um risco aumentado de desenvolver melanoma são xeroderma pigmentoso, retinoblastoma familiar, síndrome de Lynch tipo II e síndrome de Li-Fraumeni (GOLDSTEIN e TUCKER 2001).

### 1.3 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO MELANOMA

Com o objetivo de melhorar os resultados em termos de diagnóstico e prognóstico, os avanços da biotecnologia permitiram conhecer melhor os mecanismos moleculares que participam da carcinogênese do melanoma cutâneo, e, com essa motivação, em 2015, um programa patrocinado pelo *National Cancer Institute* (NCI) e o *National Human Genome Research Institute* (NHGRI) deu origem ao *The Cancer Genoma Atlas* (TCGA) do melanoma cutâneo. Esse programa realizou uma caracterização sistemática de 333 melanomas cutâneos para criar um catálogo das

alterações somáticas e descrever seu significado biológico e potencial clínico. Com isso, foi estabelecida uma estrutura genômica/transcriptômica de classificação dos melanomas cutâneos com implicações no prognóstico e no desenvolvimento de terapias.

No TCGA, estão descritas 13 mutações encontradas no melanoma cutâneo em genes oncogênicos e supressores tumorais, sendo eles: *BRAF*, *NRAS*, *NF1*, *CDKN2A*, *TP53*, *PTEN*, *RAC1*, *MAP2K1*, *PPP6C*, *ARID2*, *MSH*, *BCL2* e *E-Caderina*. A classificação molecular do melanoma foi feita com base nos genes com maior prevalência de mutação, e com isso, subdividindo o melanoma em quatro subtipos moleculares: *BRAF* mutante, *RAS* mutante, *NF1* mutante e *Triple Wild-Type* (ausência de mutações nesses três genes anteriores) (MILLER e MIHM 2006; Cancer Genoma Atlas Network 2015).

As mutações *hot-spot* (locais do DNA em que as mutações ocorrem a uma taxa até 100 vezes superior ao normal) no códon V<sup>600</sup> de *BRAF* foram observadas em 35% a 50% dos casos, e no códon Q61 do *NRAS* foram observadas em 10% a 25% dos casos de melanoma cutâneo (TSAO et al. 2012). As mutações no gene *NF1* ocorreram em cerca de 15% dos casos e representam o terceiro tipo mais comum. O quarto tipo, o *Triple Wild-Type* é um subgrupo heterogêneo sem mutações nos genes anteriores e representa cerca de 10% dos melanomas. Essa classificação genética forneceu uma estrutura para explorar como alterações moleculares adicionais podem explicar as diferenças biológicas e clínicas observadas entre os subtipos de melanoma cutâneo. Além disso, a classificação molecular do melanoma também permitiu a identificação de alvos terapêuticos e biomarcadores preditivos, bem como uma orientação

potencialmente útil para decisões no tratamento (Genomic Classification of Cutaneous Melanoma 2015).

#### **1.4 TRATAMENTO DO MELANOMA CUTÂNEO**

O tratamento do melanoma primário consiste na ressecção cirúrgica com margens amplas, incluindo o subcutâneo subjacente. As margens de ressecção variam de acordo com a profundidade do melanoma primário medida em milímetros (espessura de Breslow). Nas lesões in situ, a margem preconizada é de 0,5 centímetros ao redor da lesão ou da cicatriz da biópsia. Os melanomas com Breslow de até 1 milímetro, são tratados com ampliação de margens de 1 centímetro. Os melanomas com Breslow entre 1 e 2 milímetros, são tratados com margens entre 1 e 2 centímetros (VERONESI et al. 1988; VERONESI e CASCINELLI 1991; COHN-CEDERMARK et al. 2000; KHAYAT et al. 2003). As lesões com Breslow maior do que 2 milímetros são tratadas com margens de 2 centímetros (KARAKOUSIS et al. 1996; CASCINELLI 1998; HEATON et al. 1998). Não existe mais a necessidade de ressecção da fáscia muscular subjacente ao tumor (GROTZ et al. 2013).

Os linfonodos regionais são foco frequente de doença metastática em pacientes com melanoma. A incidência de metástases linfonodais varia de 12 a 60%, dependendo do estadio da doença (FRANCKEN et al. 2005). Os pacientes com linfonodos clinicamente comprometidos são submetidos a biópsia do linfonodo para confirmação diagnóstica, e posteriormente, à linfadenectomia radical da estação linfonodal acometida. O procedimento radical melhora o controle regional da doença (KRETSCHMER e PREUSSER 2001). As linfadenectomias radicais podem acarretar

sequelas estéticas e funcionais permanentes. O linfedema crônico dos membros é a complicação mais importante e ocorre em 15 a 30% dos pacientes operados (SHAW e RUMBALL 1990; WRIGHTSON et al. 2003).

Os pacientes com linfonodos regionais clinicamente negativos são submetidos à linfocintigrafia pré-operatória e biópsia do linfonodo sentinela. Aproximadamente 20% dos pacientes submetidos ao procedimento apresentam micrometástases linfonodais (MORTON et al. 2006). Os critérios de indicação para a realização da biópsia do linfonodo sentinela são pacientes com Breslow  $\geq 1$  milímetro de espessura ou pacientes com Breslow entre 0,8 – 1,0 milímetros que apresentem algum fator de pior prognóstico, como ulceração ou índice mitótico  $\geq 1$  mitose/mm<sup>2</sup> (WONG et al. 2017). O procedimento consiste em injetar um marcador radioativo (Tc-99m) peritumoral ou pericatricial algumas horas antes da cirurgia de ampliação das margens. O Tc-99m vai migrar via linfáticos regionais aferentes para o primeiro linfonodo de drenagem da cadeia regional, o chamado linfonodo sentinela. No momento da cirurgia de ampliação de margens, é injetado 01 mililitro de corante azul patente no mesmo local onde foi injetado o Tc-99m, que também migra pelo linfático aferente e facilita a visualização do linfonodo sentinela. Durante a cirurgia utiliza-se um captador de radiação (gama-probe) para localização do linfonodo e sua posterior ressecção cirúrgica (MUDUN et al. 1996).

O linfonodo sentinela é submetido ao exame histopatológico completo, com cortes seriados com diâmetro de 1 a 2 mm por todo linfonodo e confecção de lâminas coradas em hematoxilina e eosina e lâminas preparadas para imunohistoquímica com marcadores para S100, HMB45 ou Melan-A. O objetivo da realização da biópsia do linfonodo sentinela é a verificação de doença micrometastática no interior do

linfonodo (MITTELDORF et al. 2009). A biópsia do linfonodo sentinela é um procedimento de baixa morbidade e tem como vantagem fornecer informações quanto ao estadiamento e quanto à recomendação de tratamento adjuvante para os pacientes com acometimento linfonodal. Contudo a sua realização não está associada à aumento de sobrevida global (MORTON et al. 2014).

Nos pacientes com linfonodo sentinela positivo, a linfadenectomia radical deixou de ser obrigatória após a publicação dos resultados de dois estudos randomizados que não demonstraram aumento de sobrevida nos pacientes submetidos a complementação da linfadenectomia. Desta forma, atualmente também pode ser recomendado não submeter esses pacientes a linfadenectomia radical, desde que haja disponibilidade para acompanhamento com observação clínica e ultrassonográfica rigorosa (LEITER et al. 2016; FARIES et al. 2017).

Na doença metastática ou irresssecável o tratamento de escolha é a utilização de terapia alvo ou inibidores de “checkpoint” (imunoterapia). A terapia alvo consiste em bloquear as vias de crescimento mutadas que dão estímulo à divisão celular tumoral, como no caso da mutação do  $BRAF^{V600}$ , que estimula a via da MAPK. As drogas que inibem o  $BRAF^{V600}$  como o vemurafenibe e o dabrafenibe ou que inibem o MEK (na mesma via MAPK), como o trametinibe ou cobimetinibe, utilizadas isoladamente ou associadas, levaram a aumento de sobrevida em pacientes com melanoma metastático (LARKIN et al. 2014; ROBERT et al. 2015a).

A imunoterapia no melanoma utiliza anticorpos monoclonais que bloqueiam os receptores de inibição de células efectoras TCD4+ e TCD8+, evitando a indução de apoptose dessas células, e com isso, aumentando a resposta imune anti-tumoral. As drogas que bloqueiam o receptor de PD1 (nivolumabe e pembrolizumabe) ou que

bloqueiam o CTLA-4 (ipilimumabe) estão associadas ao aumento significativo de sobrevida nos pacientes com melanoma metastático. O bloqueio combinado de ambos de PD1 e CTLA4 esteve associado a um maior percentual de respostas completas duráveis (ROBERT et al. 2015b; WOLCHOK et al. 2017).

## 1.5 SISTEMA IMUNE E CÂNCER

As células tumorais são frequentemente rodeadas por um infiltrado de células inflamatórias, particularmente linfócitos e macrófagos. A partir de estudos em animais experimentais, foi demonstrado que as células do sistema imune podem eliminar células tumorais, um processo chamado imunovigilância (EMENS et al. 2004; SMYTH et al. 2006).

Alguns cientistas propuseram o conceito de imunovigilância do câncer há 50 anos atrás, e BURNET (1970) definiu da seguinte forma: "Em grandes animais de vida longa, como a maioria dos vertebrados de sangue quente, alterações genéticas hereditárias devem ser comuns em células somáticas e uma proporção dessas mudanças vai representar um passo em direção a malignidade. É uma necessidade evolutiva que deva haver algum mecanismo para a eliminação ou inativação de tais células mutantes potencialmente perigosas e é postulado que este mecanismo é de caráter imunológico" (BURNET 1970). Porém, um conceito oposto e muito influente foi proposto por BALKWILL e MANTOVANI em 2001, sugerindo que as células imunes e citocinas inflamatórias encontradas no microambiente tumoral podem promover a progressão tumoral, ao invés de suprimir o crescimento do tumor

(BALKWILL e MANTOVANI 2001; BALKWILL 2004; MANTOVANI et al. 2008; FRIDMAN et al. 2013).

### 1.5.1 Imunidade inata

Dentre os fatores envolvidos na imunovigilância destacam-se os mecanismos da imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata, é a primeira linha de defesa que se caracteriza por uma resposta rápida e inespecífica, sendo composta por células fagocíticas (monócitos/macrófagos e neutrófilos), células *Natural Killer* (NK), células linfóides inatas, proteínas do sistema complemento, citocinas e quimiocinas (MANTOVANI et al. 2008).

Os neutrófilos e monócitos/macrófagos são células que tem a fagocitose como um dos principais mecanismos de defesa contra os patógenos extracelulares, e apresentam receptores de reconhecimento padrão que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular pattern*). Além do reconhecimento dos PAMPs, existem mecanismos de resposta imune para antígenos oriundos de danos/injúria tecidual, sendo denominado padrões moleculares associados a injúria tecidual (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular pattern*), e essas moléculas ativam o sistema imune de forma análoga aos PAMPs (MATZINGER 2002). As interações entre os receptores de reconhecimento de padrões e PAMPs/DAMPs promovem a ativação dessas células com produção de mediadores como citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, e de quimiocinas que promovem a migração celular para o tecido (CRUVINEL et al. 2010).

Os neutrófilos possuem importantes funções na fase inicial das reações inflamatórias e são ativados pela ação das anafilatoxinas (C3a e C5a), proteínas

derivadas do sistema complemento, e mediadores inflamatórios produzidos por mastócitos e basófilos no tecido. Estão entre as primeiras células a serem recrutadas em grandes números para os locais de infecção atraídos por quimiocinas, como a IL-8. GUGLIETTA et al. (2016) demonstraram que a ativação do sistema complemento, a formação de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NET), coagulação e a reprogramação imune estão associadas à tumorigênese espontânea.

Os monócitos constituem 3% a 8 % dos leucócitos circulantes e, no tecido conjuntivo ou parênquima de órgãos, dão origem a macrófagos e células dendríticas monocitóides. Os macrófagos são fagócitos eficientes e podem permanecer no tecido por meses a anos. Além de sua ação na imunidade inata, processam e apresentam antígenos via moléculas de MHC, estimulando assim, a resposta mediada por linfócitos T efetores (FRIDMAN et al. 2011).

Os macrófagos são ativados pelos microorganismos e por substâncias produzidas pelas lesões teciduais, desempenhando um papel fundamental na homeostase e reparo dos tecidos (LAVIN et al. 2015). Como essas células estão envolvidas no processo inflamatório associado ao câncer, elas estão presentes em todas as etapas da progressão da neoplasia, desde a transformação em células neoplásicas até a progressão tumoral (NOY e POLLARD 2014; KITAMURA et al. 2015; GONZALEZ et al. 2018).

Quando os macrófagos são expostos a estímulos inflamatórios, eles secretam citocinas, como TNF, IL1, IL6, IL8 e IL12. Embora monócitos e macrófagos sejam as principais fontes dessas citocinas, elas também são produzidas por linfócitos ativados, células endoteliais e fibroblastos. Além disso, macrófagos liberam quimiocinas, leucotrienos, prostaglandinas, e complemento. Todas essas moléculas, em conjunto,

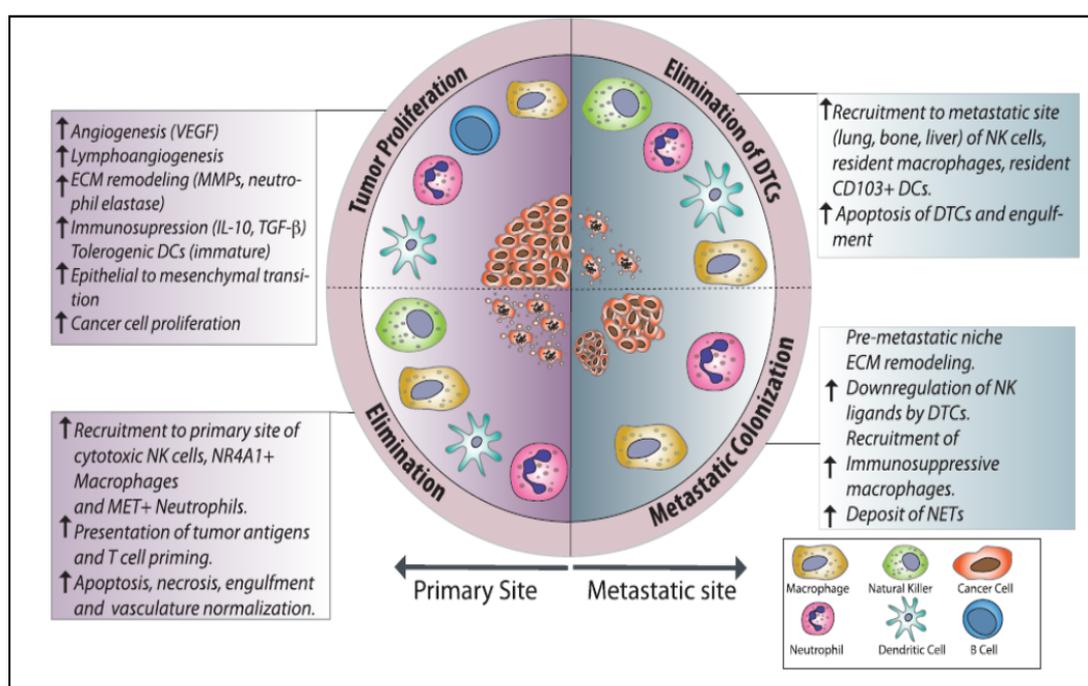
podem induzir aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de células inflamatórias. Além dos efeitos locais, esses mediadores também produzem efeitos sistêmicos, como febre e produção de proteínas de resposta inflamatória aguda. A resposta inflamatória é benéfica para o hospedeiro quando essas citocinas são produzidas em quantidades apropriadas, mas tóxicas quando produzidas de forma desregulada (ARANGO et al. 2013).

Em pacientes oncológicos e modelos experimentais pré-clínicos, macrófagos associados a tumores (TAMs, do inglês *tumor-associated macrophages*) estão relacionados a pior prognóstico e sobrevida global (ZHANG et al. 2012; NOY e POLLARD 2014). Os macrófagos ativados são chamados de pró-inflamatórios (tipo M1) ou antiinflamatórios (tipo M2,) (MANTOVANI et al. 2002). Durante a carcinogênese, os macrófagos antitumorais exibem uma polarização do tipo M1, e desempenham um papel relevante na eliminação de células tumorais mais imunogênicas. À medida que o tumor progride, os mediadores inflamatórios produzidos no microambiente tumoral desencadeiam uma polarização dos macrófagos associados ao tumor para tipo M2 que é protumoral (MANTOVANI et al. 2017).

Os TAMs promovem a progressão tumoral de diferentes maneiras, como o aumento da angiogênese e linfangiogênese, estimulando a proliferação de células tumorais e a transição epitelio-mesenquimal (MEC), limitando a eficácia das terapias, remodelando a MEC, promovendo metástases e induzindo imunossupressão de células imunes antitumorais (DENARDO et al. 2011; QIAN et al. 2015; MANTOVANI et al. 2017). (Figura 7).

Os TAMs secretam citocinas como IL10 (NG et al. 2013) e TGF- $\beta$  (MCINTIRE et al. 2004) que induzem a imunossupressão da resposta imune anti-

tumoral (Figura 7). Os TAMs são recrutados para os tumores por meio de quimiocinas, incluindo CCL2/MCP-1 (NAKATSUMI et al. 2017) e CCL5/RANTES (HALAMA et al. 2016). A IL10 produzida por macrófagos M2 pode inibir a produção de citocinas inflamatórias como IL1, IL6, IL12, TNF- $\alpha$  e de algumas quimiocinas. As citocinas e quimiocinas são produzidas por várias células do sistema imune e são essenciais para resposta inflamatória, angiogênese e comunicação entre a imunidade inata e adaptativa (GLIMCHER e MURPHY 2000).



Fonte: GONZALEZ et al. (2018)

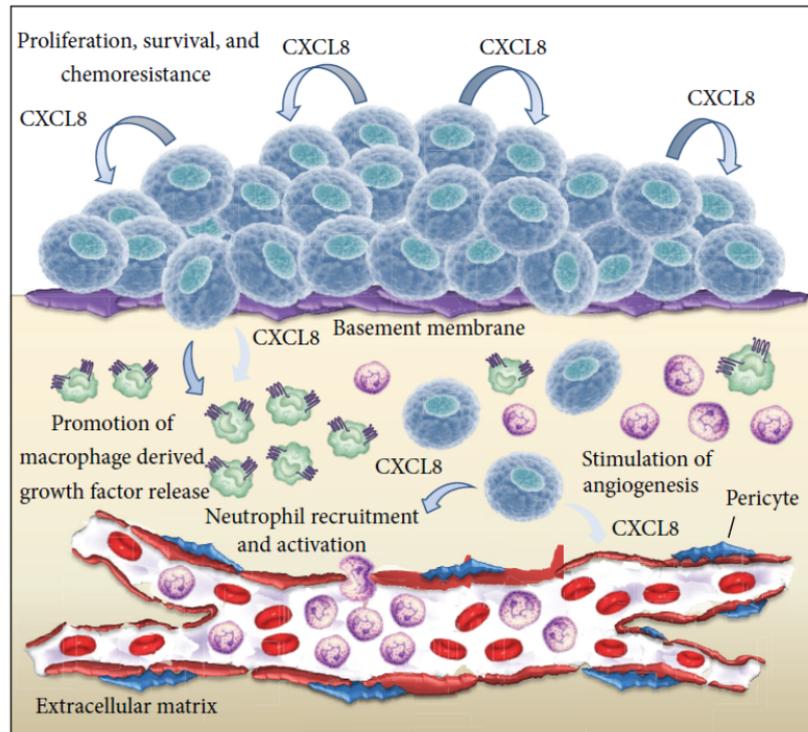
**Figura 7** - Funções das células imunes inatas nos tumores metastáticos. Uma visão geral das funções pro-tumorais e anti-tumorais de células da imunidade inata, como macrófagos, neutrófilos, células NK e células dendríticas. Processos tais como angiogênese, transição epitélio-mesenquimal (MEC) e evasão da resposta imune são mediadas por TAMs (*tumor-associated macrophages*), neutrófilos associados a tumores (TANs) e células dendríticas imaturas (DCs, *dendritic cells*), resultando na rápida progressão tumoral e metástase. Em contraste, o recrutamento de macrófagos do tipo M1 e neutrófilos do tipo N1, células NK, e DC maduras leva a eliminação do tumor nos sítios primários e após a disseminação. (DTC - célula tumoral disseminada).

A inflamação e angiogênese, embora sejam processos distintos, são eventos intimamente relacionados à capacidade das células endoteliais e dos leucócitos para responder a estímulos comuns, como as quimiocinas (ZHANG et al. 2003; PAGÈS et al. 2005). Estruturalmente, as quimiocinas são agrupadas em 4 famílias (designadas CC, CXC, C e CX3C). Os membros da família CXC estão entre as primeiras quimiocinas identificadas como reguladoras da angiogênese. Essa família inclui *CXC ligand 1* (CXCL1), CXCL2, CXCL3, CXCL4/platelet factor-4 (PF4), CXCL5, CXCL8/IL8, CXCL9/MIG (*monokine induced by IFN- $\gamma$* ), CXCL10/IP10 entre outras (LUSTER. 1998; ZLOTINIC e YOSHIE 2000).

O estabelecimento de um microambiente tumoral pró-angiogênico é resultado de uma elevada expressão de fatores angiogênicos ou uma supressão inadequada de moléculas angiostáticas. Essa desregulação promove o crescimento, sobrevivência, invasão e metástases pelo tumor. A quimiocina CXCL8/IL8 foi associada ao crescimento de tumores e metástases. A produção de CXCL8/IL8 pelas células tumorais promove a progressão do tumor através de vias de sinalização autócrinas. Essa quimiocina quando derivada das células tumorais, promove angiogênese, invasão celular e migração. Além disso, a CXCL8 induz uma infiltração quimiotática de neutrófilos no microambiente tumoral e a liberação de fatores de crescimento para os TAMs. O fator de transcrição TWIST1 promove a angiogênese e a progressão tumoral sem aumentar a secreção de VEGF, mas induzindo a expressão do CCL2, quimioatraente de monócitos, também conhecido como MCP1. O aumento do gradiente de CCL2 no microambiente tumoral, promove a quimiotaxia de monócitos e por sua vez, diferenciação em macrófagos tecidual, promovendo a angiogênese e progressão tumoral (SANTONI et al. 2014) (Figuras 8 e 9).

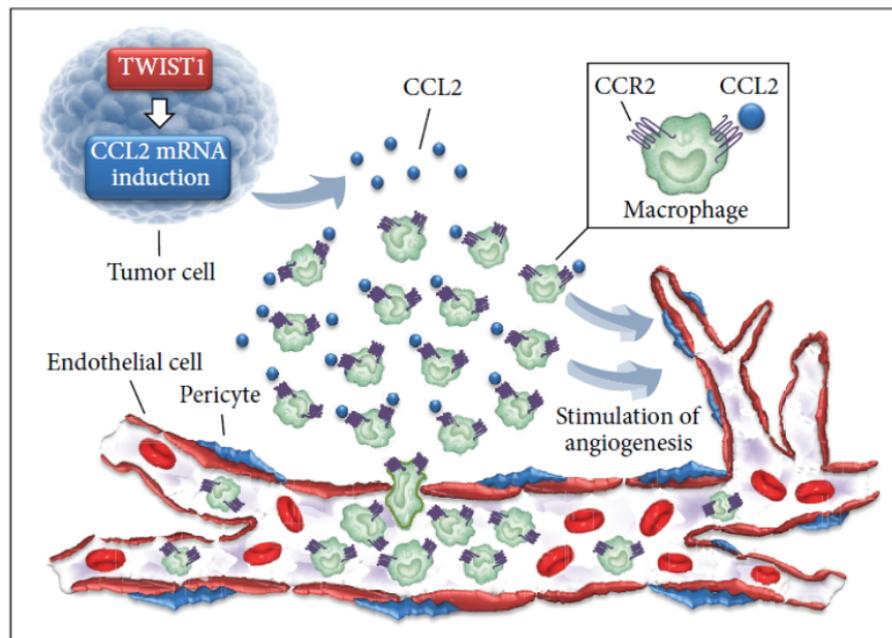
As células mielóides derivadas supressoras (MDSC), que representam uma população de monócitos (principalmente) e granulócitos imaturos, estão presentes geralmente no microambiente tumoral por meio da ação das quimiocinas CCL2/MCP-1 e CCL5/RANTES. As MDSC apresentam efeito imunossupressor favorecendo o crescimento tumoral (GABRILOVICH e NAGARAJ 2009). CCL2 e CCL5 também promovem invasão e metástase por ativação de vias de crescimento celular, induzindo a secreção de metaloproteinase 9 (MMP-9), produzida pelos TAMs, e que degrada a matriz extracelular facilitando a invasão tumoral (WOLF et al. 2012) (Figura 7).

CXCL8 (IL8) é importante na biologia tumoral por inibir a apoptose das células endoteliais e promovendo sua multiplicação, produção de metaloproteinases 2 e 9 e regulação da angiogênese com efeitos positivos para as células tumorais (LI et al. 2014). Em melanoma, CXCL8 promove a proliferação celular e angiogênese, e aumenta a capacidade de invasão e o comportamento migratório das células tumorais (GABELLINI et al. 2009).



Fonte: SANTONI et al. (2014)

Figura 8 - O papel da sinalização de CXCL8 (IL8) no microambiente tumoral.



Fonte: SANTONI et al. (2014)

Figura 9 - O papel da sinalização de CCL2/MCP1 no microambiente tumoral.

### 1.5.2 Imunidade adaptativa

Por sua vez, outras populações celulares também produzem citocinas e quimiocinas, sendo essas células componentes da imunidade adaptativa, como os linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> efetores. A imunidade adaptativa está associada à resposta específica e de memória, cujos componentes celulares apresentam um amplo repertório de reconhecimento de antígenos (GLIMCHER e MURPHY 2000). Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> apresentam um amplo repertório de reconhecimento antigênico e exibem grande plasticidade. Diferenciam-se em diferentes subpopulações T efectoras (T helper - Th) conforme o perfil de citocinas produzidas, sendo as mais estudadas, as respostas celulares Th1, Th2, Th17 e T reguladores (Treg). Os linfócitos Th1 produzem interleucina 2 (IL2), IFN- $\gamma$ , *Tumoral Necrosis Factor alfa* (TNF- $\alpha$ ) e atuam na resposta imune celular; os linfócitos Th2 produzem IL1, IL4, IL5, IL9, e IL13 e estão envolvidos com a resposta imune humoral; os linfócitos Th17 produzem IL17, IL21 e IL22 e estão envolvidos com processos inflamatórios e autoimunes (GLIMCHER e MURPHY 2000; LUCKHEERAM et al. 2012).

O sistema imunológico pode suprimir o crescimento do tumor ou promover inflamação crônica no microambiente tumoral, que pode levar ao seu crescimento (SCHREIBER et al. 2011). Durante os primeiros estágios do desenvolvimento do tumor, células citotóxicas NK e células TCD8<sup>+</sup> reconhecem e eliminam antígenos tumorais mais imunogênicos (TENG et al. 2015). As quimiocinas CXCL9 (MIG) e CXCL10 (IP10) atraem essas células TCD8<sup>+</sup> citotóxicas ao microambiente tumoral via receptor CXCR3, e estão correlacionadas com diminuição dos níveis de metástases em tumores de cólon e ovário. CXCL9 e CXCL10 também inibem angiogênese, tendo uma ação antitumoral (ZHANG et al. 2003; PAGÈS et al. 2005).

A resposta imune celular também é responsável pelos mecanismos de autotolerância, sendo que um dos tipos de células mais conhecidos na regulação do sistema imune é a Treg, responsável pela manutenção do equilíbrio orgânico. As Treg promovem a tolerância periférica com a supressão de células autoreativas e são capazes de inibir as funções efetoras dos linfócitos TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>, células NK, células dendríticas e macrófagos por meio do contato célula-célula e da produção de citocinas *Transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) e IL10 (MILLS 2004; PETERSON 2012).

Diversos estudos tem mostrado que as citocinas influenciam na evolução e prognóstico do melanoma cutâneo. O aumento dos níveis plasmáticos de IL2, IL6 e IL10 estariam relacionados com progressão do tumor, sugerindo que IL2 e IL6 possam ser usados como marcadores de presença de doença linfonodal, como linfonodo sentinela positivo (KUCERA et al. 2015). A citocina IL10 pode promover a expansão clonal de células Th2, porém sua principal função é de imunossupressão, inibindo a função das células TCD8<sup>+</sup> citotóxicas via células Treg (DENNIS et al. 2013).

As células T efetoras produzem mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) que é uma citocina tóxica em altas doses para células tumorais, contudo existem evidências de que ela possa promover a progressão do tumor (CANDIDO e HAGEMANN 2013). Por sua vez, existe um grupo de receptores pertencentes à superfamília dos receptores de TNF (TNFR), com aproximadamente 50 membros, que são proteínas expressas na superfície celular e na forma solúvel e são predominantemente presentes em células da linhagem hematopoiética. Quando essas proteínas são ativadas por seu ligante específico, uma ampla variedade de eventos celulares ocorre, como a diferenciação, proliferação, apoptose, sobrevivência celular

e aumento da produção de citocinas e quimiocinas (WEINBERG et al. 2000; BREMER 2013).

Um dos membros da família dos receptores de TNF, é a molécula co-estimuladora CD40, que está expressa na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como as células B maduras, monócitos, células dendríticas, células endoteliais e células epiteliais. A sua ativação através do ligante de CD40 (CD40L) promove a diferenciação de células B, e ativação dos fagócitos e das células dendríticas, com aumento na apresentação de antígenos e na produção de citocinas por essas células, além de um subsequente aumento da ativação de células T antígeno específicas (MORAN et al. 2013). O CD40 também pode estar expresso na superfície de uma grande variedade de tumores primários. Os estudos clínicos iniciais com anticorpo agonista de CD40 mostraram um aumento na resposta de linfócitos T citotóxicos contra antígenos tumorais, o que demonstra que a estimulação de CD40 pode levar a uma eficaz resposta antitumoral. Os receptores CD40 e CD40L presentes na membrana celular também se apresentam na forma solúvel (livre no plasma), sendo denominados sCD40 e sCD40L (THOMAS e STOREY 2015).

Além disso, o CD40L é expresso na superfície de plaquetas e induz a cascata de coagulação extrínseca, ativa células dendríticas e ativa os linfócitos B e T. Tal capacidade sugere que o CD40L derivado das plaquetas faz a comunicação entre a imunidade inata e adaptativa (THOMAS e STOREY 2015). O contato entre receptores plaquetários e seus ligantes, que são apresentados por exposição da matriz extracelular subendotelial (MES) ou presentes em algumas células tumorais, induz à ativação plaquetária. Esta ativação causa uma remodelação do citoesqueleto e alteração morfológica das células, de discóide para esférica, e desencadeia a exocitose de densos

grânulos e pequenas vesículas intracelulares as quais são encontradas somente nas plaquetas e em seus progenitores (STEGNER e NIESWANDT 2011). As plaquetas ativadas podem liberar CD40L solúvel e são responsáveis por aproximadamente 95% da sCD40L em circulação. O CD40L é uma citocina essencial que leva à ativação de um amplo espectro de células imunes (SETIANTO et al. 2010).

## **1.6 PLAQUETAS, SISTEMA IMUNE E METÁSTASES TUMORAIS**

As plaquetas humanas são fragmentos subcelulares de megacariócitos localizados na medula óssea. Apesar dessa definição clássica, GARRAUD e COGNASSE (2015) enfatizam que as plaquetas compartilham propriedades muito semelhantes às das células. A demanda fisiológica, presença de doenças como o câncer, ou efeito de drogas podem regular a produção e envio de plaquetas para circulação. A fisiologia plaquetária é essencial para a hemostasia, a integridade vascular, angiogênese, inflamação e cicatrização de feridas. No entanto, a natureza ou a extensão das respostas ocasionadas pelos mediadores secretados por plaquetas ativadas têm recebido atenção em diversas condições deletérias, tais como doenças cardiovasculares, infecções graves, doenças autoimunes e no câncer (GARRAUD e COGNASSE 2015).

Contudo, a associação de alterações na contagem de plaquetas em doenças neoplásicas é conhecida há mais de 100 anos. VAN ES et al. (2014) relataram que aproximadamente um terço de todos os pacientes com câncer apresentam trombocitose no momento do diagnóstico, e 40% de todos os pacientes com trombocitose apresentam uma doença neoplásica. BONARDI et al. (2010) mostraram que o aumento

na contagem de plaquetas no pré-operatório de pacientes com câncer colorretal mostrou-se estar associado a prognóstico desfavorável.

Os numerosos receptores presentes na membrana plaquetária são capazes de desencadear a ativação, adesão, agregação e estabilização das plaquetas, e após ativadas, permitem que as plaquetas mudem de forma e degranulem para liberar fatores de crescimento e mediadores inflamatórios na corrente sanguínea. Esse processo cíclico recruta e agrega as plaquetas, e juntamente com a trombogênese, facilita a cicatrização de ferimentos e também leva à eliminação de bactérias (THOMAS e STOREY 2015). Essas interações celulares são estabelecidas através de um grande grupo de moléculas de adesão, que apresentam diferentes funções, e desempenham um papel importante na resposta imunológica. Uma dessas moléculas de adesão é a P-selectina (CD62P) que tem tido atenção especial, pois é responsável pela formação de agregados entre as plaquetas e os leucócitos, assim como, pelo rolamento dos leucócitos no endotélio ativado (QI et al. 2015).

RONDINA et al. (2015) mostraram que as agregações plaquetárias aos monócitos aumentam as propriedades de adesividade dessas células. Quando há agregação plaquetária aos neutrófilos, ocorre o aumento da capacidade de adesão, fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio. A circulação de células neoplásicas desencadeia o reconhecimento mediado pelas plaquetas com sua agregação e formação de trombos tumorais, sendo amplificado através dos receptores da superfície celular, citocinas inflamatórias e células do sistema imune.

QI et al. (2015), mostraram que CD62P expressa em plaquetas ativadas e nas células endoteliais tem um efeito importante sobre a adesão de células tumorais com o endotélio vascular. Em alguns casos, essas interações com as plaquetas impedem o

reconhecimento antigênico e eliminação de células tumorais pelos leucócitos, ou promovem o sequestro das células tumorais na microcirculação, garantindo sua sobrevivência. Sugeriu-se que esse mecanismo é responsável pela persistência da doença, disseminação de células neoplásicas e o estabelecimento de micrometástases. Além de proteger as células tumorais da imunovigilância na circulação, as plaquetas expressam várias moléculas de adesão na membrana que facilitam o processo metastático por promover a aderência endotelial e extravasamento tumoral.

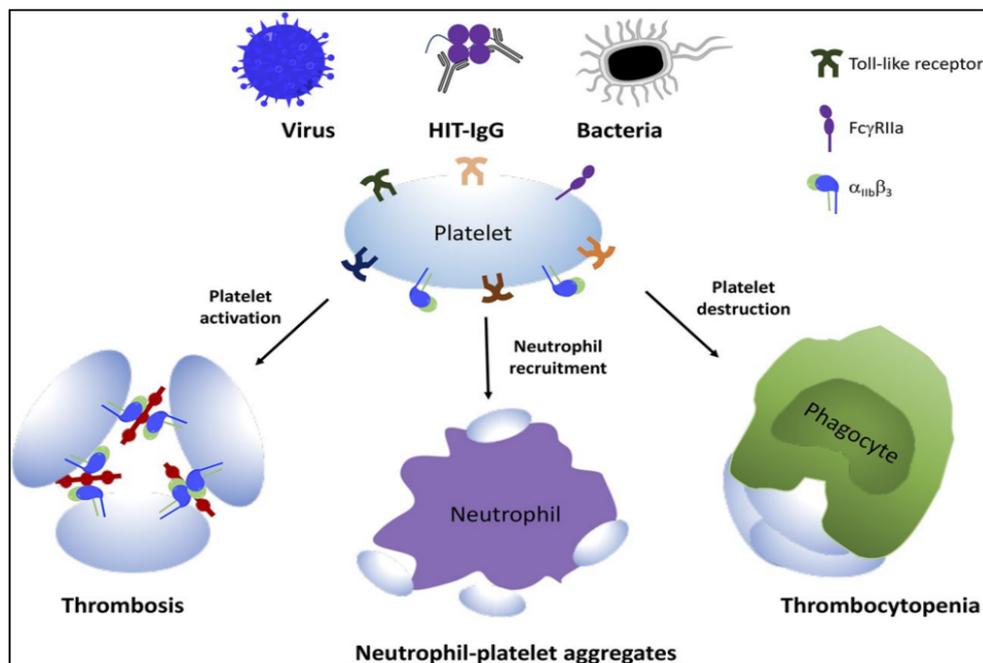
A ativação plaquetária *in vivo* pode ser determinada pela medição de fatores solúveis dos grânulos das plaquetas ou da superfície plaquetária que são liberados na circulação após ativação. REIDL et al. (2014) relataram que outra possibilidade é a análise da expressão de CD62P na superfície celular da plaqueta ativada por citometria de fluxo. Portanto, as complexas interações entre os tipos de células no microambiente tecidual podem regular o crescimento de tumores, progressão, metástase e angiogênese. As células e mediadores inflamatórios se formam em sua maior parte no microambiente tumoral. O processo inflamatório altera a imunidade adaptativa e, assim, a resposta aos hormônios e quimioterapia (CANDIDO e HAGEMANN 2013).

Após entrar na circulação, as células tumorais estão sujeitas ao dano celular ocasionado pelo fluxo sanguíneo e o ataque de células NK. As plaquetas tem um efeito de proteção das células tumorais circulantes por formar agregados plaquetários ao redor das mesmas evitando danos causados pelo fluxo sanguíneo e o ataque das células NK (NIESWANDT et al. 1999). Este mecanismo de proteção está relacionado com secreção de TGF $\beta$  pelas plaquetas que causa uma regulação negativa do receptor NKG2D das células NK com diminuição de sua atividade antitumoral. A ativação plaquetária e o fibrinogênio presente nos agregados também aumentam o potencial

metastático das células tumorais por inibir a atividade das células NK e proteger o êmbolo tumoral na microcirculação (KOPP et al. 2009).

O CD62P tem um papel crucial no recrutamento de leucócitos e formação do trombo tumoral (SCHLESINGER 2018). Estudos em camundongos mostram que CD62P aumenta a deposição de plaquetas no tumor, aumentando o seu crescimento (QI et al. 2014). O CD62P também aumenta o potencial metastático das células B16F10 de melanoma em estudo em ratos por ativar a via MAPK (BECKER et al. 2017). Em câncer colorretal, as plaquetas se ligam às células tumorais via CD62P, na presença de polimorfonucleares, ativando a microvascularização endotelial com secreção de CCL5/RANTES e aumentando o potencial metastático (LAÜBLI et al. 2009).

No entanto, alguns autores têm demonstrado uma perda da expressão de CD62P na superfície das plaquetas após o início da sua ativação, traduzindo-se em aumento dos níveis séricos de CD62P (MICHELSON et al. 2001). Porém, estudos demonstram que os agregados de plaquetas-monócitos e plaquetas-neutrófilos, cuja formação é mediada pela interação entre as moléculas de adesão na superfície das plaquetas, como CD62P, podem ser uma alternativa sensível e confiável para mensurar a ativação plaquetária (MICHELSON et al. 2001; YIP et al. 2013) (Figura 10).



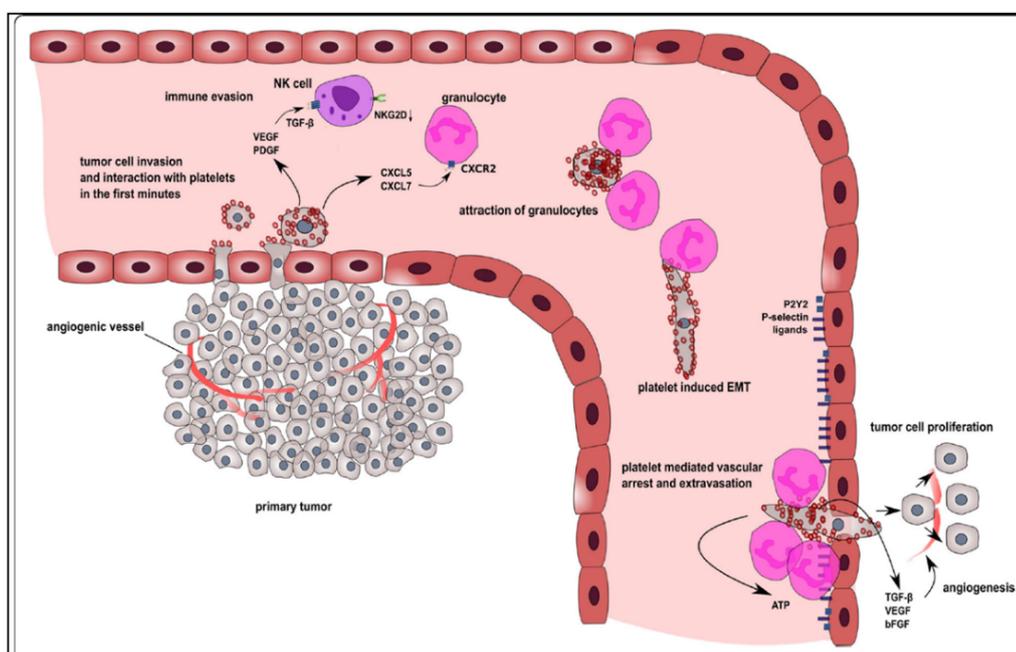
Fonte: YEUNG et al. (2018)

**Figura 10** - O papel das plaquetas na resposta imune. As plaquetas podem interagir direta ou indiretamente com componentes dos vírus, bactérias ou mesmo drogas como heparina para induzir a ativação plaquetária e interação com neutrófilos ou outros fagócitos, resultando na formação de agregados de plaquetas-neutrófilos ou trombocitopenia.

Além dos agregados de plaquetas e leucócitos, diferentes tipos de células tumorais também podem induzir a agregação plaquetária e, assim, conferir vantagem de sobrevivência na circulação. A agregação tumor-plaquetas pode proteger as células tumorais da defesa pelo sistema imune promovida pelas células NK (PALUMBO et al. 2005), sendo um mecanismo de escape tumoral. Os agregados plaquetários são cruciais para disseminação de células tumorais, pois menos de 0,1% das células tumorais vão conseguir sobreviver na corrente sanguínea de forma livre (FIDLER 1970). Após escapar do sistema imune, as células aderem aos órgãos distantes e começam a extravasar e colonizar os tecidos-alvo. Para ocorrer o extravasamento, os clones tumorais precisam aderir ao endotélio para posterior migração transendotelial.

Esse processo é mediado por diferentes receptores de adesão entre o tumor e as células endoteliais, mas são facilitados pela ação das plaquetas (MILES et al. 2008).

As plaquetas são reguladoras da permeabilidade vascular e o crescimento de focos metastáticos é altamente dependente da neoangiogênese. Além de induzir a formação de novos vasos, as plaquetas são importantes para a estabilização dos vasos recém-formados (RHEE et al. 2004) (Figura 11).



Fonte: SCHLESINGER (2018)

**Figura 11** - Visão geral esquemática da cascata metastática com foco em plaquetas.

As plaquetas secretam fatores de crescimento e quimiocinas que induzem anergia de células NK devido à regulação negativa do receptor NKG2D. As plaquetas promovem a parada das células tumorais na parede vascular via P-selectina e seus ligantes e facilitam o extravasamento do trombo tumoral.

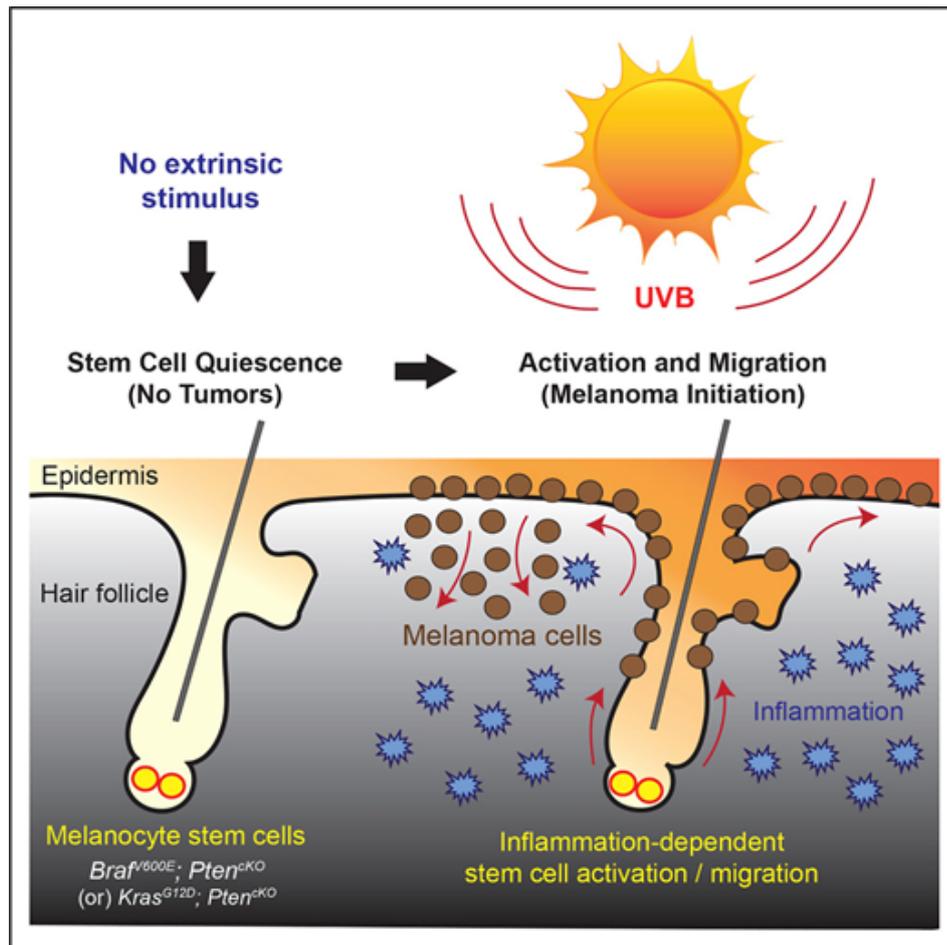
## 1.7 INFLAMAÇÃO E IMUNOVIGILÂNCIA NO MELANOMA

A inflamação desempenha um papel importante na interação entre as respostas imunes inata e adaptativa, sendo fundamental para proteção contra tumores. Nos

estágios iniciais da formação do melanoma, a inflamação induzida pela radiação UV está associada ao aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e danos às estruturas subcelulares resultantes da produção de espécies reativas de oxigênio. A influência de fatores ambientais como a radiação UV podem induzir os melanócitos e queratinócitos a produzir mediadores inflamatórios que levam ao desenvolvimento de melanoma devido às suas características imunossupressoras, e eventualmente, de crescimento, invasão e metástase.

A imunossupressão induzida pela radiação UV contribui para a gênese do melanoma através da redução do número de células dendríticas da pele (células de Langerhans), e com isso reduzindo a apresentação de antígenos, e na produção de citocinas do tipo Th2, como IL4, IL10 e prostaglandina E2. A radiação ultravioleta também estimula a produção de fatores de crescimento, como *melanocyte-stimulating factor* (MSF) e *platelet-activating factor* (PAF). A neuropilina-1, um membro da família do *vascular endothelial growth factor* (VEGF), contribui para os efeitos pró-tumorais das células Treg no melanoma. Seus efeitos parecem ser mediados pelo TGF $\beta$  em sinergismo com o VEGF (KANAVY e GERSTENBLITH 2011; SAHU et al. 2012; ULLRICH e BYRNE 2012.).

Em 2017, MOON et al. mostraram que os melanomas podem surgir de células tronco melanocíticas (*melanocytic stem cells*- MSC). Em modelo animal, esses autores demonstraram que a quiescência das MSC atua como um supressor de tumor, e identificaram os fatores ambientais e moleculares necessários para as etapas iniciais da formação do melanoma. Especificamente, os melanomas originam-se de MSC competentes após estimulação por UVB, o que induz a ativação e translocação de MSC através de um processo dependente de inflamação (MOON et al. 2017) (Figura 12).



Fonte: MOON et al. (2017)

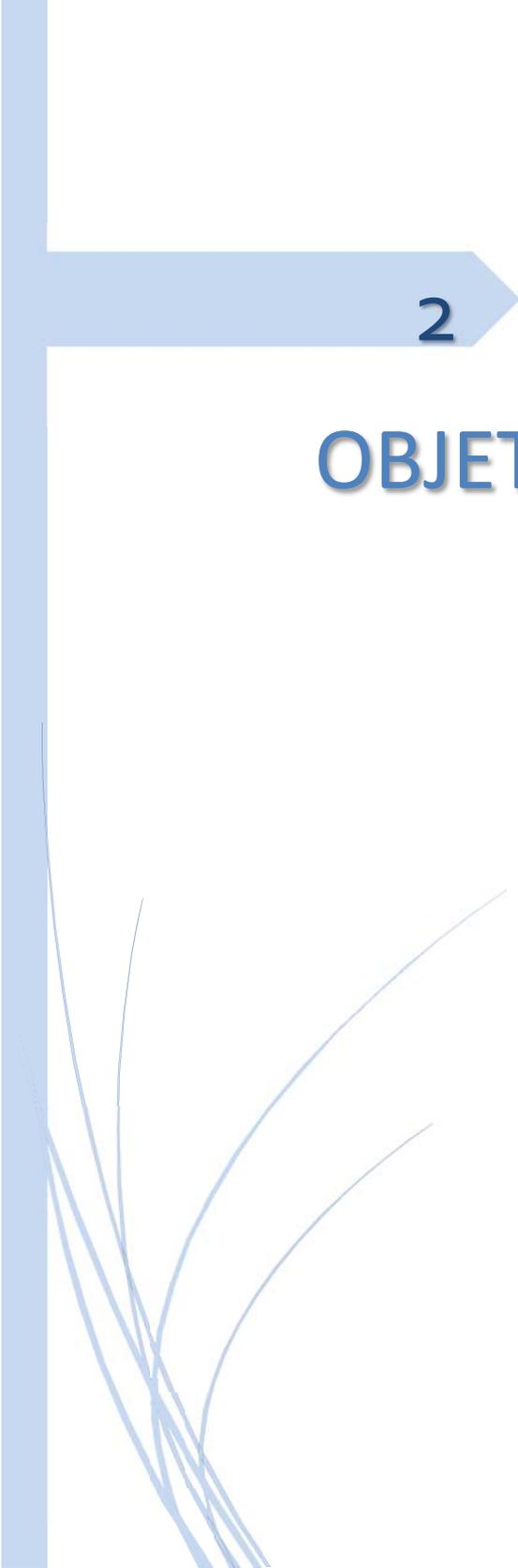
**Figura 12** - Ativação e migração das células tronco melanocíticas (*melanocytic stem cells* - MSC) em resposta à exposição à radiação UVB com início do melanoma cutâneo.

Entre as questões críticas não resolvidas em relação à biologia do melanoma está o controle da disseminação para os linfonodos regionais e o papel desempenhado pelas células e moléculas do sistema imunológico. É cada vez mais evidente que os linfonodos não são meros receptores passivos de células de melanoma. Quando as células neoplásicas atravessam os linfáticos regionais, importantes interações intercelulares e eventos intracelulares controlam esse fenômeno (BRAEUER et al. 2014).

Os linfonodos podem ter um papel ativo na disseminação de células de melanoma através da quimiocina CCL1, que é produzida pelas células endoteliais linfáticas, e que se liga ao receptor CCR8 presente nas células tumorais, levando a migração dessas células para o tecido linfonodal (DAS et al. 2013). Alguns autores mostraram que os linfonodos pré-metastáticos de pacientes com melanoma têm alterações na função dos receptores de células T. As metástases linfonodais estabelecidas também apresentam infiltrados de células característicos de inflamação crônica, com células Treg, células dendríticas tolerogênicas e macrófagos associados a tumores, que são responsáveis por ocasionar imunossupressão (NEGIN et al. 2008; DAS et al. 2013; MOHOS et al. 2013).

Embora o melanoma não esteja entre as neoplasias malignas que surgem no contexto de inflamação crônica, seu estabelecimento está associado ao desenvolvimento de um microambiente inflamatório que inicia e mantém um perfil de resposta tipo Th2, com componentes celulares e moleculares que favorecem o comportamento altamente invasivo e metastático. Alguns mediadores inflamatórios e alvos terapêuticos importantes incluem quimiocinas e seus receptores, particularmente CCL5/RANTES, CCL11/eotaxina, CXCL10/IP10 e VEGF, e as citocinas TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL1, IL6 e IL8, todas exercendo efeitos inflamatórios pleiotrópicos. É provável que o microambiente do melanoma seja mais inflamatório com elevados níveis de citocinas, quimiocinas, neurotransmissores, fatores de crescimento/receptores, fatores de transcrição e células inflamatórias trabalhando em conjunto para potencializar um status de crescimento e progressão tumoral (CHEN e MELLMAN 2013; ATSUMI et al. 2014).

O sistema imunológico desempenha um papel essencial em toda a história natural do melanoma, desde o nevus benigno, passando pelas fases de crescimento radial e vertical do melanoma, às vias de disseminação linfática e hematogênica, na pré-metastatização e no microambiente tumoral metastático. Paralelamente aos rápidos avanços na identificação das alterações moleculares dos diferentes tipos de melanoma, houve uma compreensão importante da imunologia do tumor, com potencial para estratégias terapêuticas altamente eficazes. Este estudo visou ampliar o conhecimento sobre os mecanismos do sistema imune que estão associados com a progressão e metástase tumoral num grupo de pacientes com melanoma cutâneo atendidos em um hospital de referência no tratamento oncológico da rede SUS do Estado de Pernambuco.



2

# OBJETIVOS

## **2 OBJETIVOS**

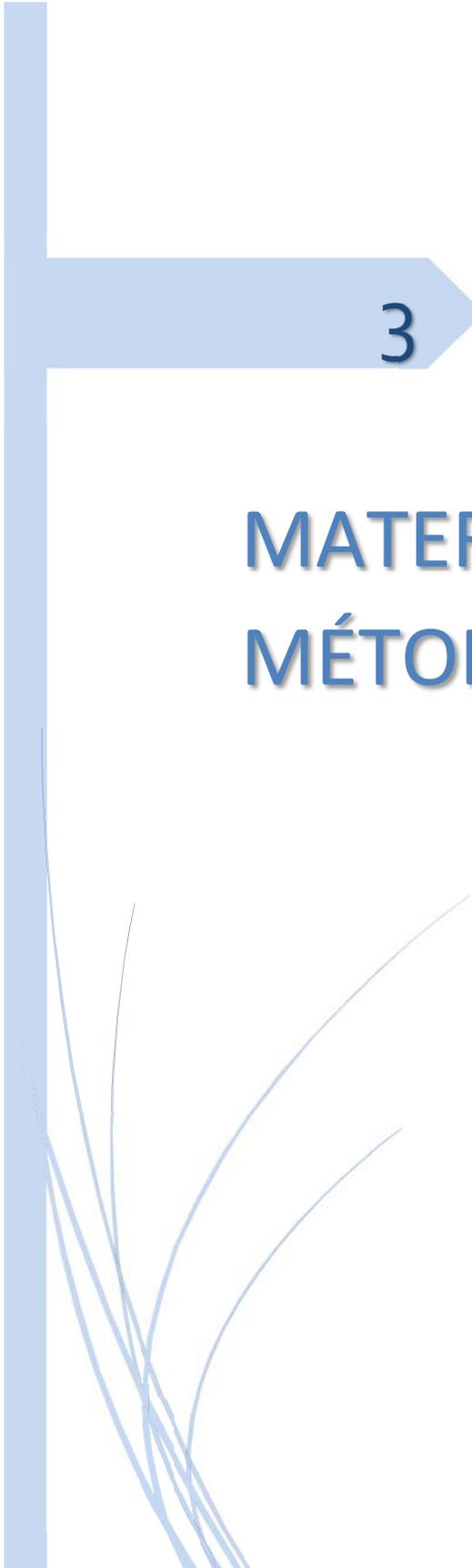
### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a expressão de citocinas e quimiocinas, dos agregados de plaquetas-leucócitos, e dos mediadores solúveis sCD40L e sCD62P no melanoma cutâneo.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

No sangue periférico de pacientes com melanoma cutâneo e controles:

- Determinar os níveis séricos das citocinas IL6, TNF $\alpha$ , IL10, IL1 $\beta$  e IL12;
- Determinar os níveis séricos das quimiocinas CXCL9, CXCL10, CCL2, CCL5 e CXCL8;
- Determinar os níveis séricos dos agregados de plaquetas-linfócitos, plaquetas-monócitos e plaquetas-neutrófilos, e dos mediadores solúveis sCD40L e sCD62P;
- Associar a expressão das citocinas e quimiocinas estudadas, dos agregados de plaquetas-leucócitos, e de sCD40L e sCD62P com os parâmetros histopatológicos, como tipo histológico, estadió, espessuras de Breslow e status linfonodal.



3

# MATERIAL E MÉTODOS

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 DETALHAMENTO DO ESTUDO**

Este é um estudo transversal realizado no período 09/2015 e 08/2018 no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e no Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HCP sob nº. CAAE 40008514.0.0000.5205 (Anexo 1), seguindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento livre esclarecido (TCLE - Apêndice 1).

#### **3.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE**

**Os critérios de inclusão foram:**

- Pacientes com confirmação diagnóstica de melanoma cutâneo;
- Idade acima de 18 anos;
- Pacientes tratados no Serviço de Cirurgia Oncológica do HCP;
- Pacientes com condições de avaliar a sua participação no estudo;
- Pacientes que concordaram em participar do estudo, e que assinaram o TCLE.

**Os Critérios de exclusão foram**

- Pacientes com diagnóstico prévio de outras doenças oncológicas;

- Pacientes com segundo tumor primário sincrônico;
- Pacientes submetidos previamente a tratamentos oncológicos;
- Pacientes com estadio IV da doença.

### **3.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO**

O grupo de estudo foi composto por 51 pacientes com diagnóstico histopatológico de melanoma cutâneo com idade acima de 18 anos, de ambos os sexos. Os pacientes apresentavam-se em diferentes estadios da doença.

O grupo controle foi composto por 30 indivíduos saudáveis com idade acima de 18 anos, acompanhantes de pacientes e funcionários do HCP, sem diagnóstico e histórico familiar de câncer ou outras doenças.

### **3.4 DEFINIÇÃO DOS TERMOS E VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS**

#### **3.4.1 Classificação, definição operacional e categorização das variáveis**

As variáveis clínicas e patológicas foram coletadas na consulta clínica ou conforme informação obtida no prontuário do paciente, incluindo exames complementares e ficha clínica padronizada. A definição e categorização das variáveis idade, faixa etária, sexo, cor, localização do tumor, tipo histológico, Breslow, ulceração, índice mitótico, status linfonodal e estadio estão descritas no Quadro 1. O estadiamento dos casos de melanoma cutâneo foi realizado de acordo com sistema

TNM da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC 2017) (Anexo 2) (GERSHENWALD et al. 2017b).

**Quadro 1** - Definição e categorização das variáveis clínicas e patológicas

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
<b>Idade</b>	Referente à idade dos pacientes em anos completos e calculada a média com desvio padrão	Variável numérica discreta – calculados os extremos para a amostra e a mediana
<b>Faixa etária</b>	Definição dos pacientes pela faixa etária entre menos de 60 anos e 60 anos ou mais	Variável categórica ordinal 1 < 60 anos 2 ≥ 60 anos
<b>Sexo</b>	Definição do sexo de nascimento dos pacientes	Variável categórica nominal 1 - Masculino 2 - Feminino
<b>Cor</b>	Definição dos pacientes pela coloração da pele	Variável categórica nominal 1 - Branca 2 - Não Branca
<b>Localização</b>	Localização do melanoma primário	Variável categórica nominal 1 – Membros inferiores 2 – Membros superiores 3 - Tronco
<b>Tipo histológico</b>	Definição dos tipos principais de melanoma cutâneo definido pelo exame histopatológico. “Outros” refere-se aos tipos histológicos raros ou não definidos	Variável categórica nominal 1 – Disseminativo superficial 2 – Nodular 3 – Lentiginoso Acral 4 - Outros
<b>Breslow</b>	Espessura do melanoma primário em milímetros definida pelo exame histopatológico. Sem informações foi definido como ausência de informação da variável.	Variável categórica ordinal 1 ≤ 4 mm 2 > 4 mm Sem informações
<b>Ulceração</b>	Definida pela presença ou ausência de ulceração no melanoma primário definida pelo exame histopatológico. Sem informações foi definida pela ausência de informação da variável.	Variável categórica nominal 1 – Não (sem ulceração) 2 – Sim (com ulceração) 3 – Sem informações
<b>Índice mitótico</b>	Definida pelo número de mitoses no melanoma primário em milímetros quadrados (mm <sup>2</sup> ) obtida no exame histopatológico. Sem informação foi definida pela ausência de informação da variável	Variável categórica ordinal 1 < 1 mitose mm <sup>2</sup> 2 ≥ 1 mitose mm <sup>2</sup> Sem informações
<b>Status linfonodal</b>	Definido pela presença ou ausência de metástases de melanoma em linfonodos da cadeia de drenagem linfática regional no exame histopatológica da linfadenectomia radical ou da biópsia do linfonodo sentinela	Variável categórica 1 – Linfonodo negativo 2 – Linfonodo positivo
<b>Estadio</b>	Estadiamento do melanoma loco regional definido pelo exame histopatológico da peça operatória utilizando o AJCC Cancer Staging Manual 8ª edição de 2017. <b>Estadio I</b> foi definido como melanomas com espessura de Breslow menores de 1mm com ou sem ulceração ou melanomas com Breslow entre 1 e 2mm sem ulceração. <b>Estadio II</b> foi definido como melanomas entre 1 e 2mm com ulceração ou melanomas acima de 2mm com ou sem ulceração com linfonodos negativos <b>Estadio III</b> foi definido como melanomas de qualquer espessura de Breslow, mas com linfonodos comprometidos pelo tumor ou presença de metástases em trânsito ou satelitose.	Variável categórica Estadio I Estadio II Estadio III

### **3.5 PROCEDIMENTOS PARA COLETA DOS DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS**

Todos os pacientes que fizeram parte deste trabalho assinaram o TCLE no momento do atendimento e responderam a um questionário padronizado (Apêndice 2). Quando necessárias, foram realizadas buscas dos dados clínicos nos prontuários, sendo esses dados transcritos para o questionário padronizado. O diagnóstico histopatológico foi realizado no Laboratório de Patologia Cirúrgica do HCP. A coleta do material biológico para o estudo histopatológico foi realizada após o procedimento cirúrgico e encaminhada para o laboratório.

Após biópsia inicial, os pacientes foram submetidos à ampliação das margens cirúrgicas entre 1 e 2 cm com ressecção de ilha de pele e subcutâneo subjacente. Os pacientes com espessura de Breslow acima de 0,75 mm ou que apresentaram ulceração ou índice mitótico  $\geq 1$  mitose /  $\text{mm}^2$  foram submetidos à biópsia do linfonodo sentinela.

O linfonodo sentinela foi localizado com a realização de uma linfocintilografia da região acometida na véspera do procedimento cirúrgico de ampliação das margens. Na cirurgia de ampliação, foi injetado 1,0 mL de corante azul patente ao lado da incisão da biópsia para facilitar a localização cirúrgica do linfonodo sentinela. Outra incisão cirúrgica foi realizada na região da cadeia linfonodal onde se encontrava o linfonodo sentinela. O linfonodo sentinela foi localizado por meio de um dispositivo captador de radiação (gama-probe) e todos os linfonodos captantes e/ou corados foram ressecados. Os pacientes que apresentaram micrometástases linfonodais no linfonodo sentinela foram submetidos à esvaziamento radical da estação linfonodal.

Todos os pacientes com linfonodos clinicamente tumorais na apresentação clínica foram submetidos à linfadenectomia radical da estação linfonodal após biópsia.

### **3.6 TESTES LABORATORIAIS**

#### **3.6.1 Coleta de sangue e preparação das amostras**

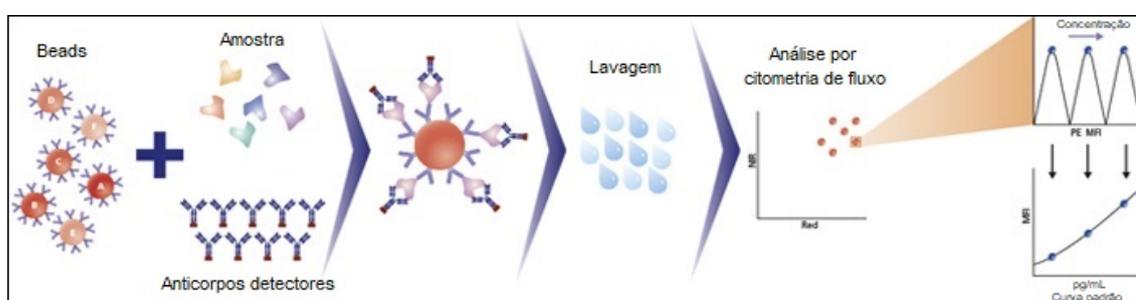
Um volume de 9 mL de sangue total foi coletado em tubo com EDTA e mantidos a 4°C por um tempo máximo de 1 hora. As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas antes da realização do tratamento oncológico.

Para as análises solúveis de sCD40L e sCD62P, o sangue total foi centrifugado a 1.800 RPM, por 5 minutos a uma temperatura de 4°C para obtenção do plasma rico em plaquetas. Posteriormente, o plasma foi separado em alíquotas de 1 mL e centrifugado a 14 000 RPM por 10 minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). Foram feitas alíquotas de 500 µL armazenadas em microtubos e foram congeladas em freezer a – 80°C até a realização dos testes laboratoriais.

#### **3.6.2 Determinação dos níveis de proteínas livres no plasma por *Cytometric Bead Array (CBA)***

O CBA é uma técnica que se baseia no uso de esferas de poliestireno, denominadas esferas de captura, marcadas com diferentes graus de fluorescência e recobertas com anticorpos monoclonais específicos para cada molécula solúvel (Figura 13). Essa técnica permite a avaliação simultânea de diversos analitos no mesmo ensaio utilizando volumes pequenos de amostra. Para dosagens, 25 µL da amostra de plasma, alíquotas de 25 µL da mistura de esferas de captura e 25 µL do

reagente de detecção, anticorpos monoclonais específicos para cada molécula solúvel/citocina conjugados ao fluoróforo PE foram utilizados. Após a incubação, foi realizada etapa de lavagem e aquisição no citômetro de fluxo. Foram adquiridos 300 eventos por molécula solúvel/citocina no equipamento de citometria de fluxo, e as concentrações nas amostras expressas em pg/mL foram determinadas a partir das curvas-padrão utilizando o *FCAP Array Software* (BD Biosciences, CA).



Fonte: Figura adaptada do catálogo da BD Biosciences.

**Figura 13** - Técnica de CBA para detecção de citocinas.

- **Dosagem da concentração de citocinas e quimiocinas por CBA**

Para determinação das concentrações das citocinas neste estudo foram utilizados BD<sup>TM</sup> CBA – *Human Inflammatory Kit* (IL1 $\beta$ , IL6, IL10, IL12 e TNF $\alpha$ ) e BD<sup>TM</sup> e de quimiocinas, BD<sup>TM</sup> CBA *Chemokines Kit* (CXCL9, CXCL10, CCL2, CCL5 e CXCL8), conforme instrução do fabricante. A aquisição foi realizada por citometria de fluxo (FACSVERSE<sup>®</sup>, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA), conforme instrução do fabricante. A análise foi realizada no *FCAP Array software* (BD Biosciences, CA).

- **Dosagem da concentração de sCD62P e sCD40L por CBA**

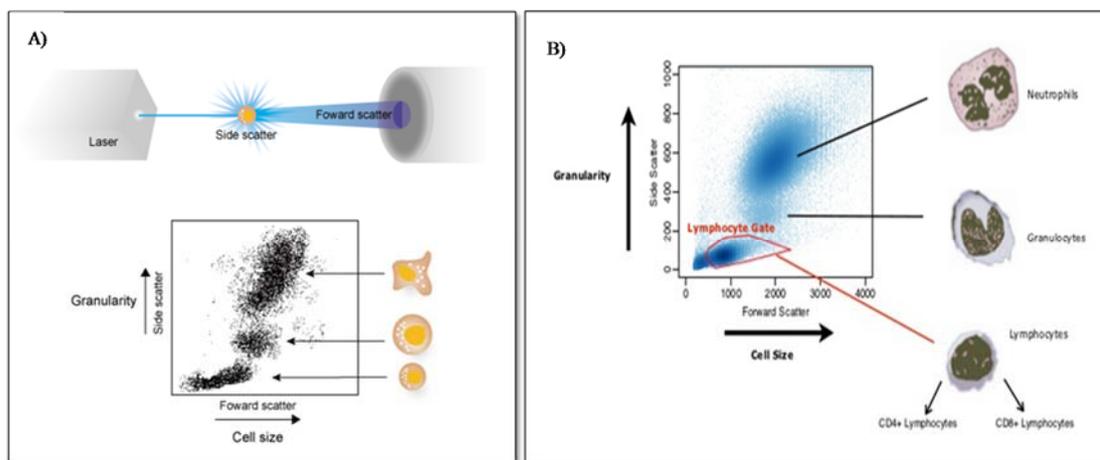
As concentrações de CD62P solúvel (sCD62P) e sCD40L no plasma foram mensuradas por meio da técnica *Cytometric Bead Array (CBA)* e do kit comercial *Human Soluble CD62P Flex Set* (BD Biosciences) e *Human Soluble CD40L Flex Set* (BD Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. Foram adquiridos 300 eventos no equipamento de citometria de fluxo (FACSVERSE®, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). A análise foi realizada no *FCAP Array software v 3.0.1* (BD Biosciences, CA). Os valores foram expressos em pg/mL.

- **Análise de agregados de plaquetas-leucócitos por citometria de fluxo**

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma tecnologia avançada e rápida que permite contar, examinar e classificar células individuais e medir simultaneamente múltiplos parâmetros. Antes da análise, as células individuais em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluoróforos, como PE, FITC, PerCP e PE-CY-7, que diferem um do outro em relação à cor que emitem. Os anticorpos monoclonais têm especificidade para moléculas expressas na membrana e no interior das células, o que possibilita caracterizar leucócitos humanos e outras células humanas, bem como analisar suas funções. Essas moléculas são identificadas como *clusters of differentiation (CD)*.

Conforme uma célula passa por um feixe de laser, a luz é espalhada em direções diferentes e dois parâmetros são definidos: tamanho de célula, representado pela dispersão direta da luz do laser (Forward Scatter - FSC); e complexidade celular (granularidade), representada por dispersão lateral da luz do laser (Side Scatter - SSC). Esta informação é exibida visualmente em um gráfico de pontos (dot plot), no qual

cada ponto representa uma única célula, diferenciadas pela forma como dispersam a luz e pela fluorescência, que é proporcional à quantidade de moléculas expressas na célula. A Figura 14 apresenta uma visão geral da imunofenotipagem por citometria de fluxo.



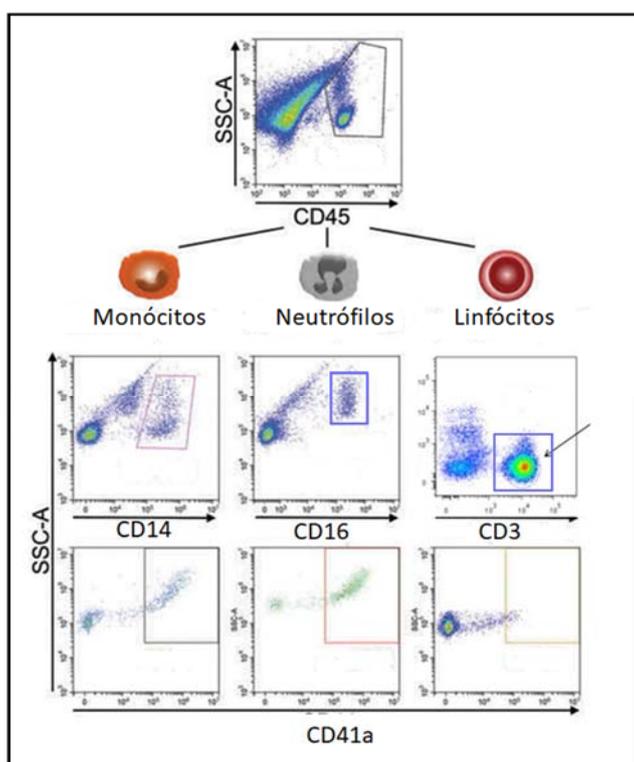
Fonte: BD Biosciences, CA.

**Figura 14** - Visão geral da imunofenotipagem por citometria de fluxo

Para as análises dos agregados de plaquetas-leucócitos, amostras de sangue venoso foram coletadas em tubos com EDTA e mantidas a 4°C por um tempo máximo de 1 hora. Para a preparação da amostra, foram realizados os protocolos descritos por MACEY et al. (2002), HARDING et al. (2007) e BOURNAZOS et al. (2008).

Foram adicionados 5 uL de anticorpos monoclonais anti-CD45, anti-CD3 para células T, anti-CD20 para células B, anti-CD41a (GPIIb/IIIa) para plaquetas, anti-CD62p (GMP 140) e anti-CD40L para avaliar ativação plaquetária, anti-CD16 para neutrófilos e anti-CD14 para monócitos (BD, Pharmigen, San Diego, CA, EUA) e incubados a 20°C por 20 minutos no escuro, conforme descrito por GRANJA et al. (2015). A lavagem das células foi realizada com 2 mL de Solução Salina Tamponada

com Fosfato (PBS) [1x] e as células foram então centrifugadas a 300 x g durante 5 min a 20°C. O procedimento de lavagem foi repetido duas vezes. Após a lavagem, os sobrenadantes foram descartados, e as células foram analisadas com 250µL de solução salina no citômetro de fluxo (FACSVERSE; Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, EUA). Para a citometria de fluxo, 20.000 eventos celulares foram adquiridos, e os resultados foram analisados pelo programa FACSuite (Becton Dickinson) (Figura 15).



**Fonte:** Adaptado de FINSTERBUSCH et al. (2018).

**Figura 15** - Imagens ilustrativas da análise dos agregados de plaquetas-leucócitos.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

- **Análise descritiva e de associação**

A estatística descritiva das variáveis categóricas foi representada em frequências absolutas e relativas, enquanto as variáveis contínuas foram apresentadas como medidas de tendência central (média/desvio padrão ou mediana e interquartil (25-75%).

Para as variáveis quantitativas, foi inicialmente aplicado o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. As variáveis quantitativas deste estudo foram apresentadas em valores de mediana e intervalo interquartil (IQR: 25%-75%). O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre dois grupos. O teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para comparação entre três ou mais grupos. Para evitar erro estatístico tipo I, as análises pelo teste *Kruskal-Wallis* foram seguidas pela correção de Dunn para testagem múltipla. Foi adotado o nível de significância estatística de  $p < 0.05$ . A análise estatística foi realizada através do programa *graphpad prism v8.0* (Graphpad software, San Diego, CA).



4

# RESULTADOS

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES

Foram avaliados 51 pacientes com melanoma cutâneo com uma média de idade de 57,6 anos ( $\pm 14,3$ ). A maioria dos pacientes foi de cor branca (72,5%) e do sexo feminino (62,7%). Quanto à localização da lesão primária, houve uma predominância de melanomas nos membros inferiores (54,9%), seguido pelos melanomas localizados no tronco (31,4%) e membros superiores (13,7%). Na análise do tipo histológico, verificou-se que 35,3% dos pacientes apresentaram melanoma do tipo disseminativo superficial (MDS), 27,4% melanoma nodular (MN) e 31,4% melanoma acral lentiginoso (MAL).

Foram 43,2% dos pacientes que apresentaram índice de Breslow  $> 4$  mm, 58,8% com lesões ulceradas, 70,5% com índice mitótico  $\geq 1$  mitose/mm<sup>2</sup>. A maioria dos pacientes apresentou metástase linfonodal (51%) e estadios III (52,9%). A descrição das características clínicas e histopatológicas dos pacientes estudados encontra-se na Tabela 1.

**Tabela 1** - Distribuição das frequências das características clínicas e histopatológicas de 51 pacientes com melanoma cutâneo atendidos no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP).

CARACTERISTICAS	N (%)
<b>Idade</b>	
Média (DP)	57,6 (± 14,3)
<b>Faixa Etária</b>	
< 60 anos	26 (50,9%)
≥ 60 anos	25 (49,1%)
<b>Sexo</b>	
Masculino	19 (37,3%)
Feminino	32 (62,7%)
<b>Cor</b>	
Branca	37 (72,5%)
Não Branca	14 (27,5%)
<b>Localização</b>	
Membros inferiores	28 (54,9%)
Membros superiores	7 (13,7%)
Tronco	16 (31,4%)
<b>Tipo histológico</b>	
Disseminativo superficial	18 (35,3%)
Nodular	14 (27,4%)
Lentiginoso acral	16 (31,4%)
Outros*	3 (5,9%)
<b>Breslow</b>	
≤ 4 mm	27 (52,9%)
> 4 mm	22 (43,2%)
Sem informações	2 (3,9%)
<b>Ulceração</b>	
Não	19 (37,3%)
Sim	30 (58,8%)
Sem informações	2 (3,9%)
<b>Índice mitótico</b>	
< 1 mitose/mm <sup>2</sup>	10 (19,7%)
≥ 1 mitose/mm <sup>2</sup>	36 (70,5%)
Sem informações	5 (9,8%)
<b>Status Linfonodal</b>	
Linfonodo negativo	25 (49,0%)
Linfonodo positivo*	26 (51,0%)
<b>Estadio</b>	
I	10 (19,7%)
II	14 (27,4%)
III	27 (52,9%)

DP: Desvio Padrão. \*Linfonodo sentinela positivo (n=12); outros: Epitelióide (n=1), sem informações (n=2)

## 4.2 ANÁLISES DAS CITOCINAS IL6, TNF $\alpha$ , IL10, IL1 $\beta$ e IL12 NO SANGUE PERIFÉRICO

Foram realizadas análises de citocinas pró-inflamatórias IL6, TNF $\alpha$ , IL10, IL1 $\beta$  e IL12 no sangue periférico em 51 pacientes com melanoma cutâneo e de 30 controles com média de idade de 56,7 anos ( $\pm$  15,5). Os níveis séricos das citocinas IL1 $\beta$  e IL12 foram indetectáveis nos pacientes e controles, por isso, não foram apresentados neste trabalho.

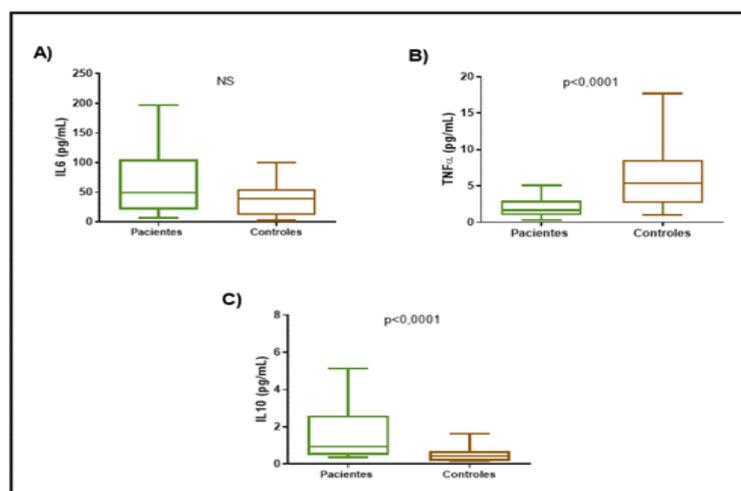
- **Entre os pacientes e controles**

Foram observados níveis séricos diminuídos de TNF $\alpha$  e elevados de IL10 nos pacientes quando comparados aos controles ( $p < 0,0001$ ). Não foram observadas diferenças significativas dos níveis de IL6 entre os pacientes e controles (Figura 16).

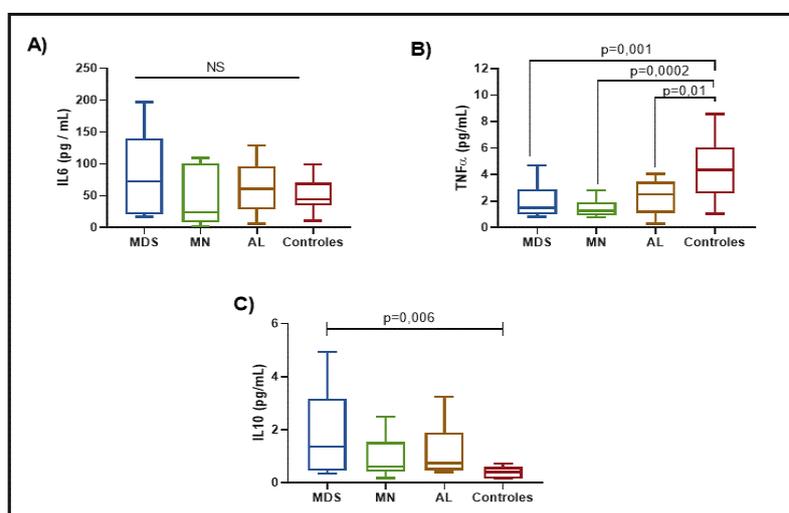
- **Entre os grupos de pacientes com tipos histológicos diferentes e os controles**

Foram observados níveis séricos diminuídos de TNF $\alpha$  nos pacientes com melanoma cutâneo dos tipos disseminativo superficial (MDS), melanoma nodular (MN), e melanoma acral lentiginoso (AL) quando comparados aos controles ( $p < 0,05$ ). Com relação a IL10, os pacientes com melanoma cutâneo do tipo MDS obtiveram os níveis elevados quando comparados aos controles ( $p = 0,006$ ). Porém, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de TNF $\alpha$  e IL10 entre os tipos de

melanoma cutâneo. Não houve diferenças significativas nos níveis de IL6 entre os grupos (Figura 17).



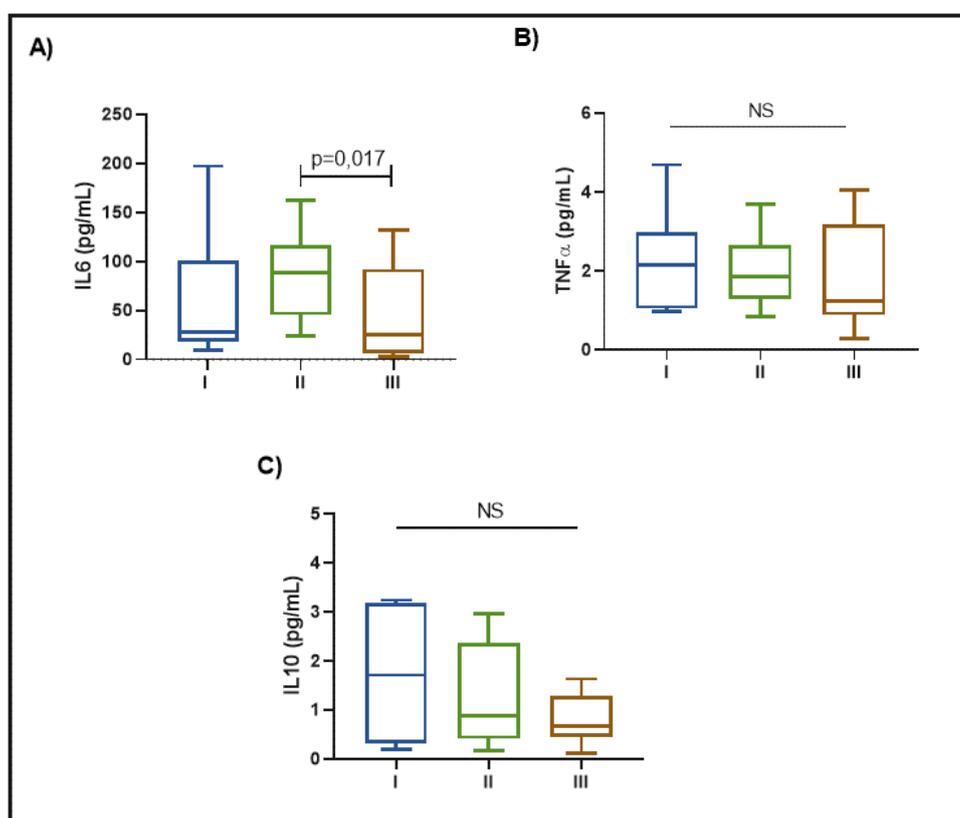
**Figura 16** - Níveis de citocinas IL6, TNF $\alpha$  e IL10 (pg/mL) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo e controles. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p<0,05$ . NS: não significativo.



**Figura 17** - Níveis de citocinas IL6, TNF $\alpha$  e IL10 (pg/mL) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo dos tipos melanoma disseminativo superficial (MDS), melanoma nodular (MN), melanoma acral lentiginoso (AL) e controles. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p<0,05$ . NS: não significativo.

- **Entre os grupos de pacientes com estádios I, II e III da doença**

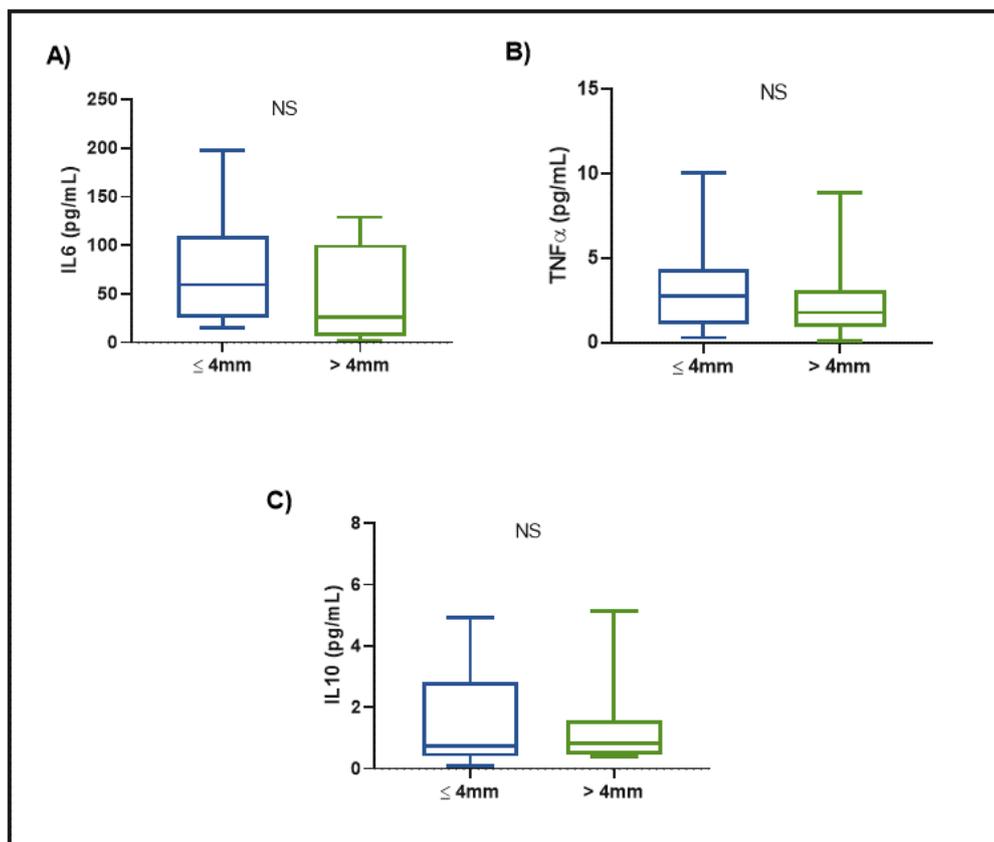
Os pacientes com melanoma cutâneo estádio II obtiveram níveis elevados de IL6 quando comparados ao estádio III ( $p=0,017$ ). O grupo de pacientes com estádio I não apresentou níveis de IL6 com diferenças significativas quando comparados aos grupos com estádio II e III. Porém, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de  $TNF\alpha$  e IL10 entre os grupos (Figura 18).



**Figura 18** - Níveis de citocinas IL6,  $TNF\alpha$  e IL10 (pg/mL) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo em estádios I, II e III da doença. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p<0,05$ . NS: não significativo.

- **Entre os grupos de pacientes com Breslow  $\leq 4$  mm ou  $> 4$  mm.**

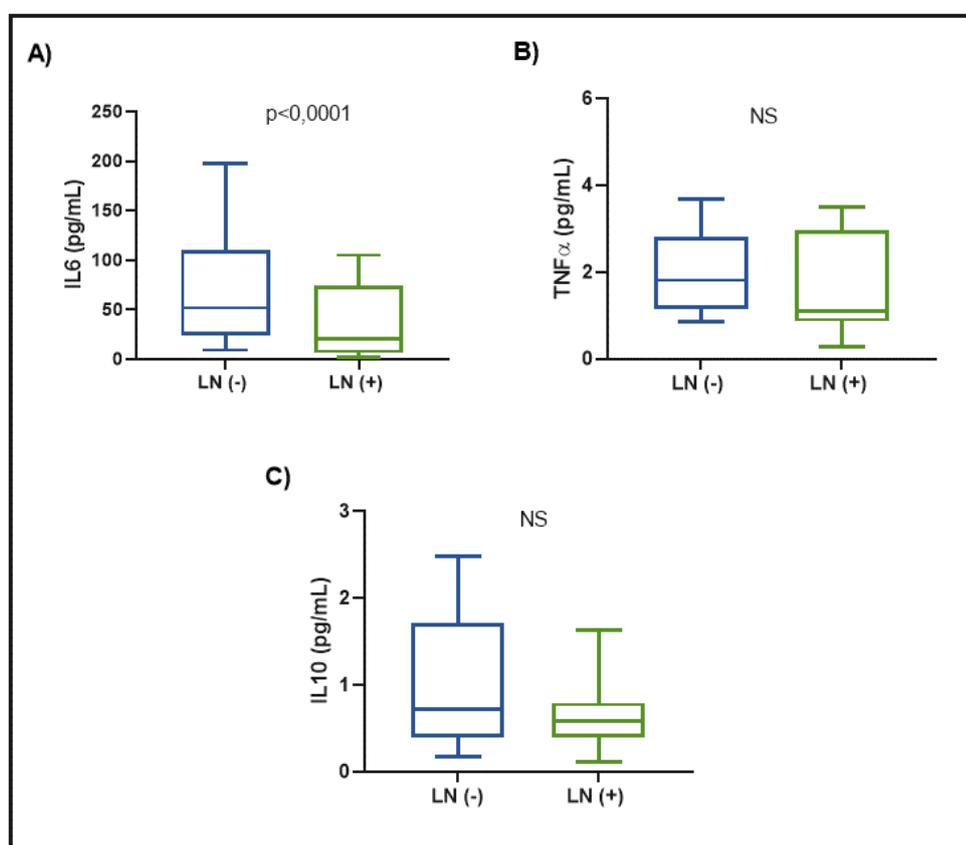
Como mostra a Figura 19, não foram verificadas diferenças significativas nos níveis séricos de IL6, TNF $\alpha$  e IL10 entre os grupos de pacientes com Breslow  $\leq 4$ mm ou  $> 4$ mm.



**Figura 19** - Níveis de citocinas IL6, TNF $\alpha$  e IL10 (pg/mL) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo com Breslow  $\leq 4$ mm ou  $> 4$ mm. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

- **Entre os grupos de pacientes com linfonodos positivos (LN+) e linfonodos negativos (LN -)**

A mediana dos níveis de IL6 foi elevada nos pacientes com linfonodos negativos quando comparada ao grupo com linfonodos positivos ( $p < 0,0001$ ). Não foram observadas diferenças significativas dos níveis séricos de  $\text{TNF}\alpha$  e IL10 entre os grupos de pacientes LN+ e LN- (Figura 20).



**Figura 20** - Níveis de citocinas IL6,  $\text{TNF}\alpha$  e IL10 (pg/mL) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo e linfonodos positivos (LN+) e negativos (LN-). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

### **4.3 ANÁLISES DAS QUIMIOCINAS IP10/CXCL10, MCP-1/CCL2, MIG/CXCL9, RANTES/CCL5 E DE IL8/CXCL8**

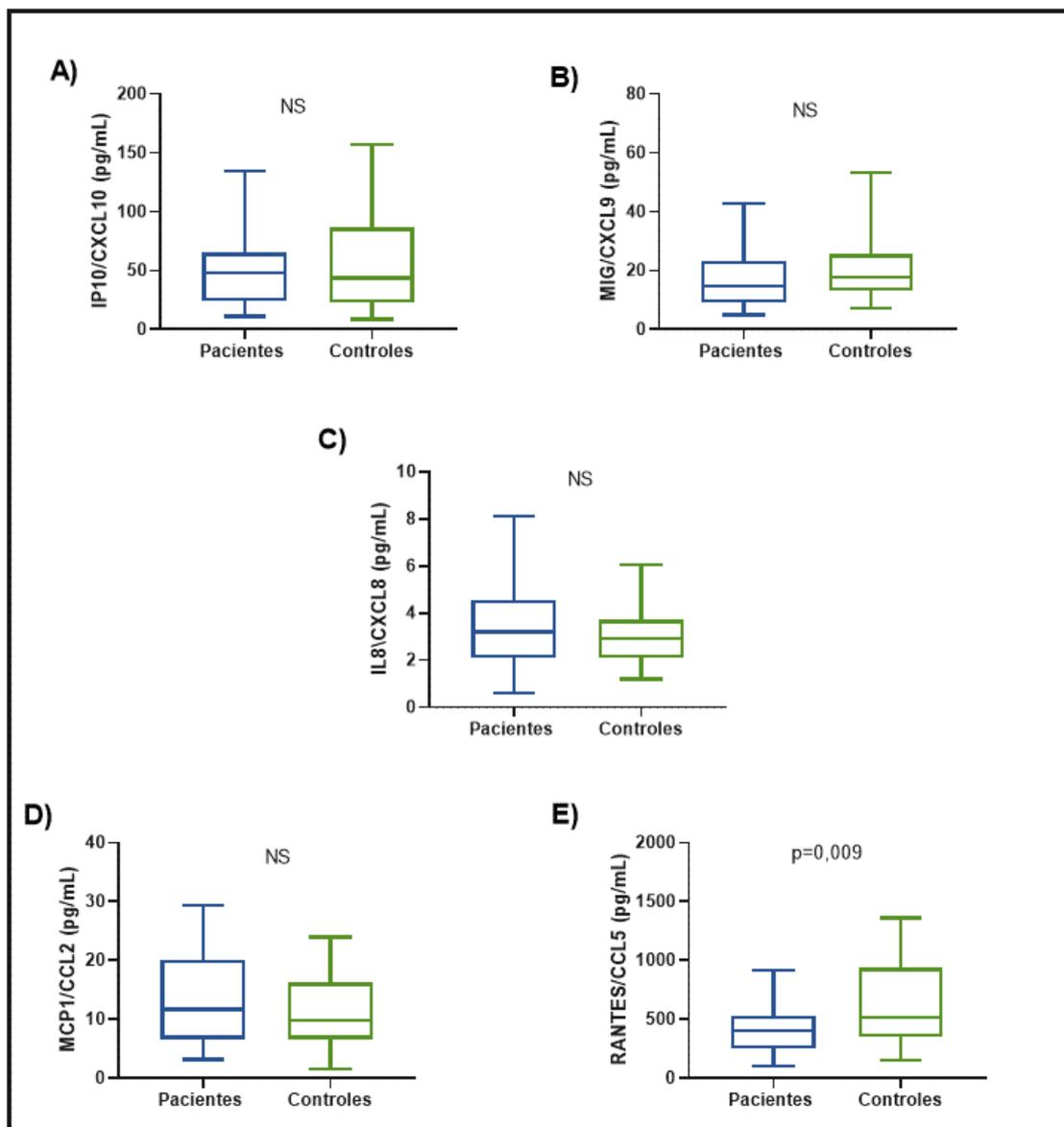
Foram realizadas análises de quimiocinas IP10/CXCL10, MCP-1/CCL2, MIG/CXCL9, RANTES/CCL5 e de IL8/CXCL8 no sangue periférico de 51 pacientes com melanoma cutâneo e de 30 controles.

- **Entre os pacientes e controles**

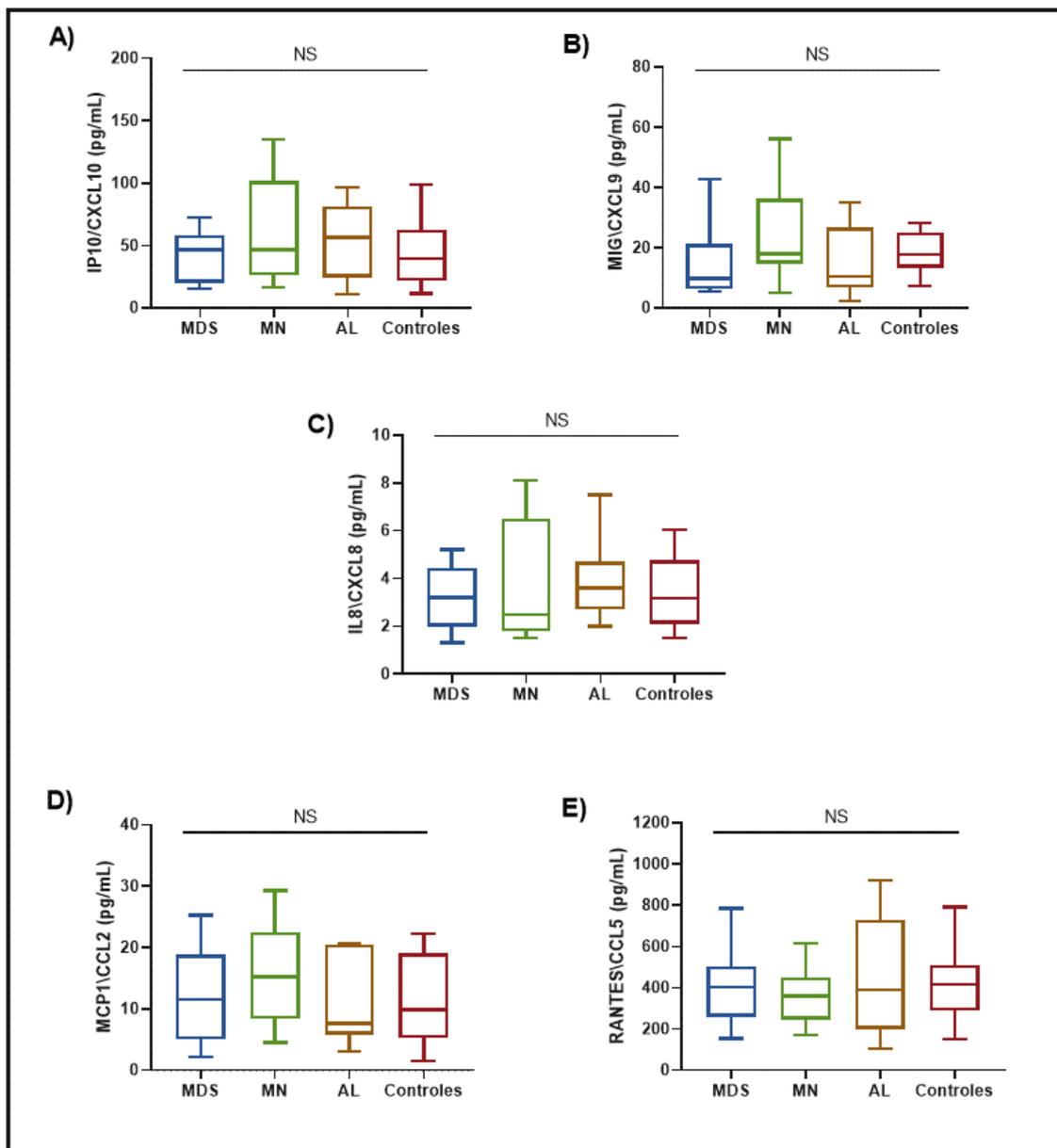
Foram observados níveis séricos diminuídos de RANTES/CCL5 nos pacientes quando comparados aos controles ( $p=0,009$ ). Não foram observadas diferenças significativas dos níveis IP10/CXCL10, MCP-1/CCL2, MIG/CXCL9, e de IL8/CXCL8 entre os pacientes e controles (Figura 21).

- **Entre os grupos de pacientes com tipos histológicos diferentes e os controles**

Não foram observadas diferenças significativas dos níveis IP10/CXCL10, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, MIG/CXCL9, e de IL8/CXCL8 entre os grupos de pacientes com melanoma cutâneo dos tipos disseminativo superficial (MDS), melanoma nodular (MN) e melanoma acral lentiginoso (AL), como também entre esses grupos e os controles (Figura 22).



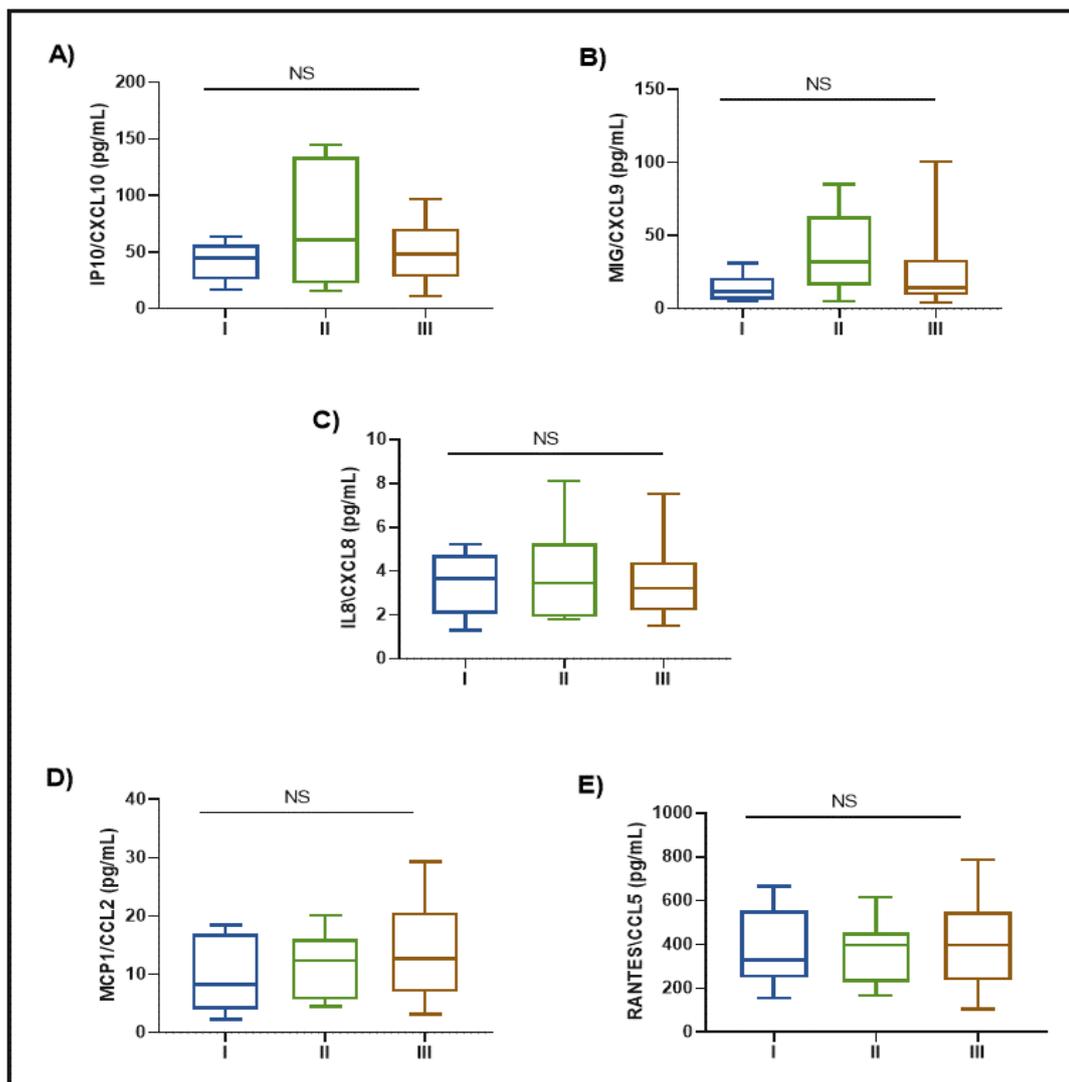
**Figura 21** - Níveis (pg/mL) de IP10/CXCL10, MIG/CXCL9, IL8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo e controles. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.



**Figura 22** - Níveis (pg/mL) de IP10/CXCL10, MIG/CXCL9, IL8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo dos tipos melanoma disseminativo superficial (MDS), melanoma nodular (MN), melanoma acral lentiginoso (AL) e controles. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

- **Entre os grupos de pacientes com estádios I, II e III da doença**

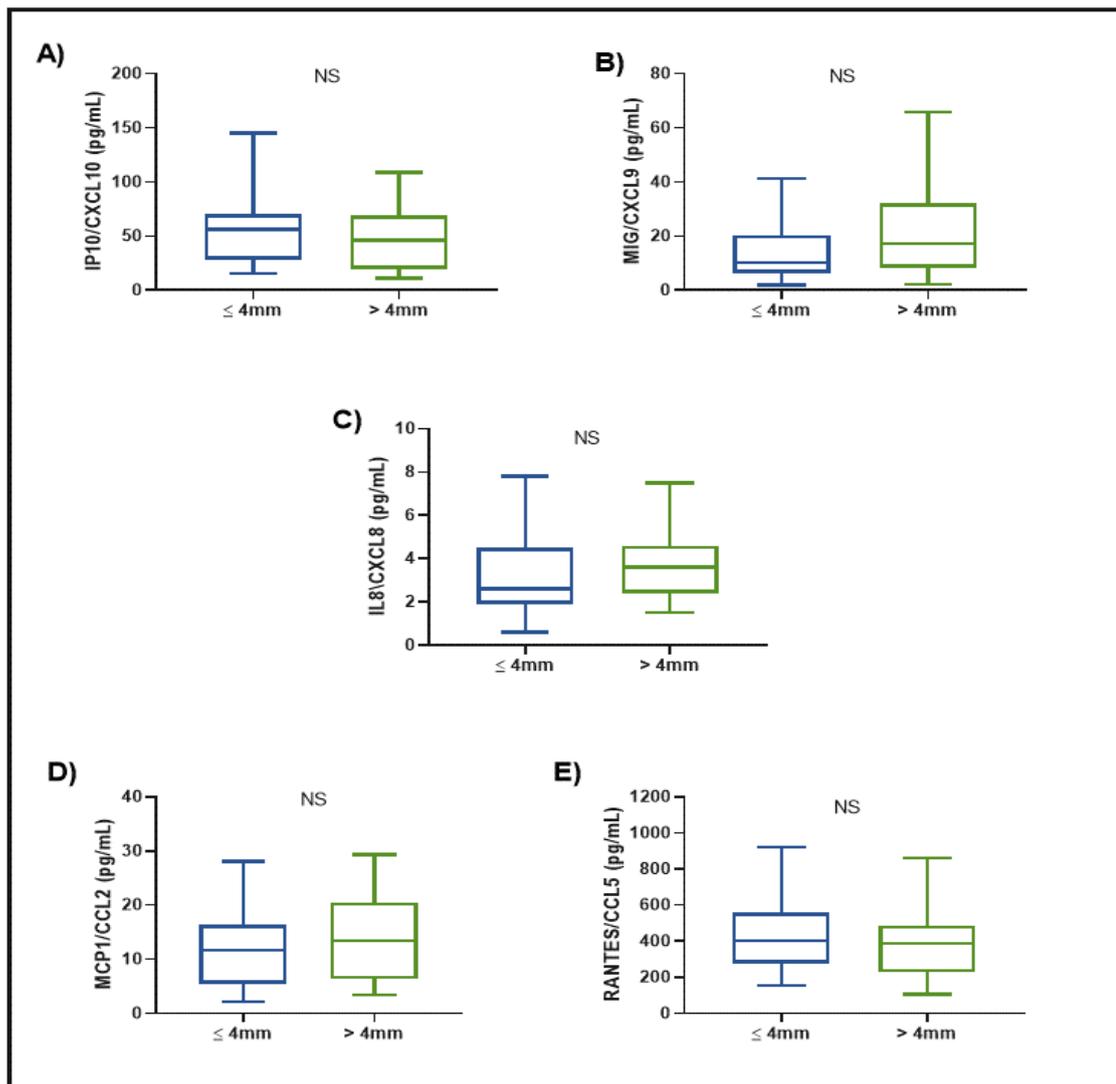
Não foram observadas diferenças significativas dos níveis IP10/CXCL10, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, MIG/CXCL9, e de IL8/CXCL8 entre os estádios I, II e III da doença (Figura 23).



**Figura 23** - Níveis (pg/mL) de IP10/CXCL10, MIG/CXCL9, IL8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo em estadio I, II e III da doença. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

- **Entre os grupos de pacientes com Breslow  $\leq 4$  mm ou  $> 4$  mm.**

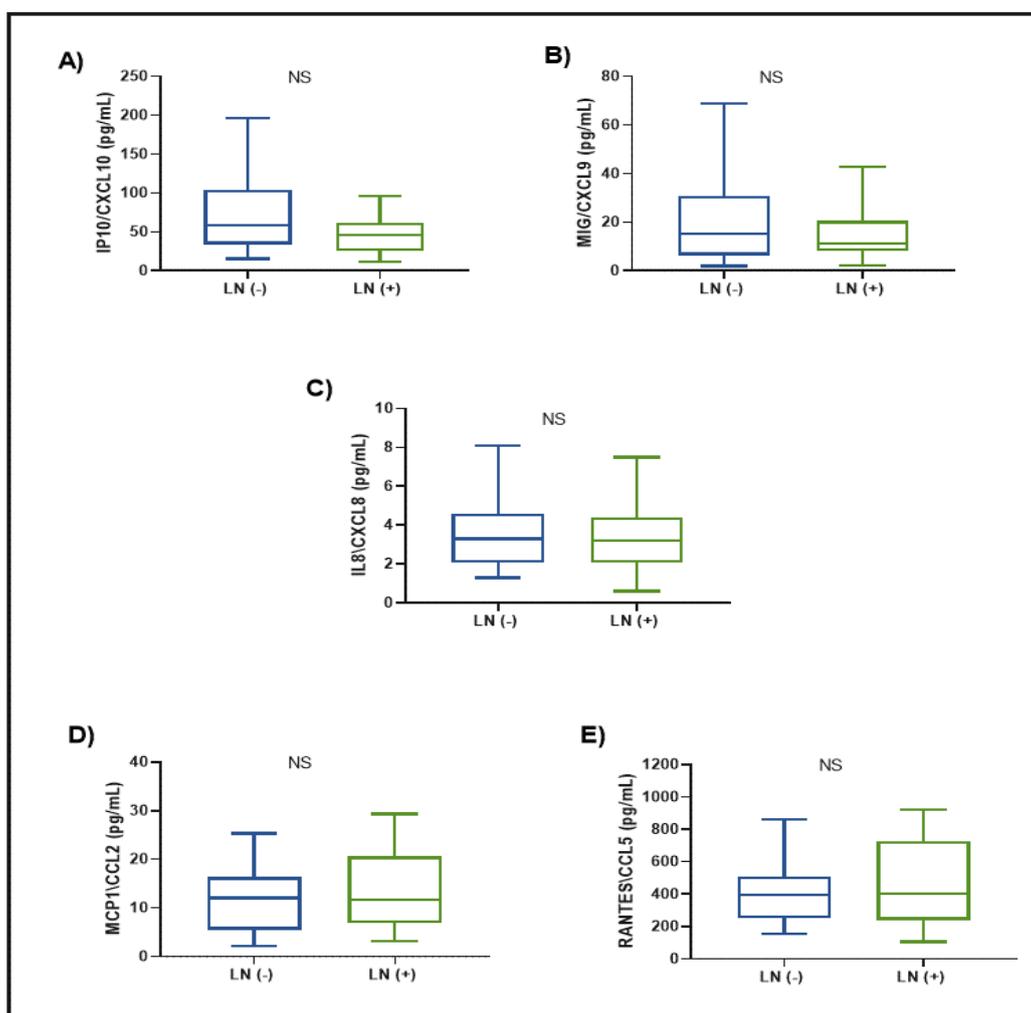
Não foram observadas diferenças significativas dos níveis IP10/CXCL10, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, MIG/CXCL9, e de IL8/CXCL8 entre os grupos de pacientes com Breslow  $\leq 4$  mm ou  $> 4$  mm (Figura 24).



**Figura 24** - Níveis (pg/mL) de IP10/CXCL10, MIG/CXCL9, IL8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo com Breslow  $\leq 4$  mm ou  $> 4$  mm. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

- **Entre os grupos de pacientes com linfonodos positivos (LN+) e linfonodos negativos (LN -)**

Não foram observadas diferenças significativas dos níveis IP10/CXCL10, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, MIG/CXCL9, e de IL8/CXCL8 entre os grupos de pacientes LN+ e LN- (Figura 25).



**Figura 25** - Níveis (pg/mL) de IP10/CXCL10, MIG/CXCL9, IL8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 no sangue periférico de pacientes com melanoma cutâneo e linfonodos positivos (LN+) e negativos (LN-). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

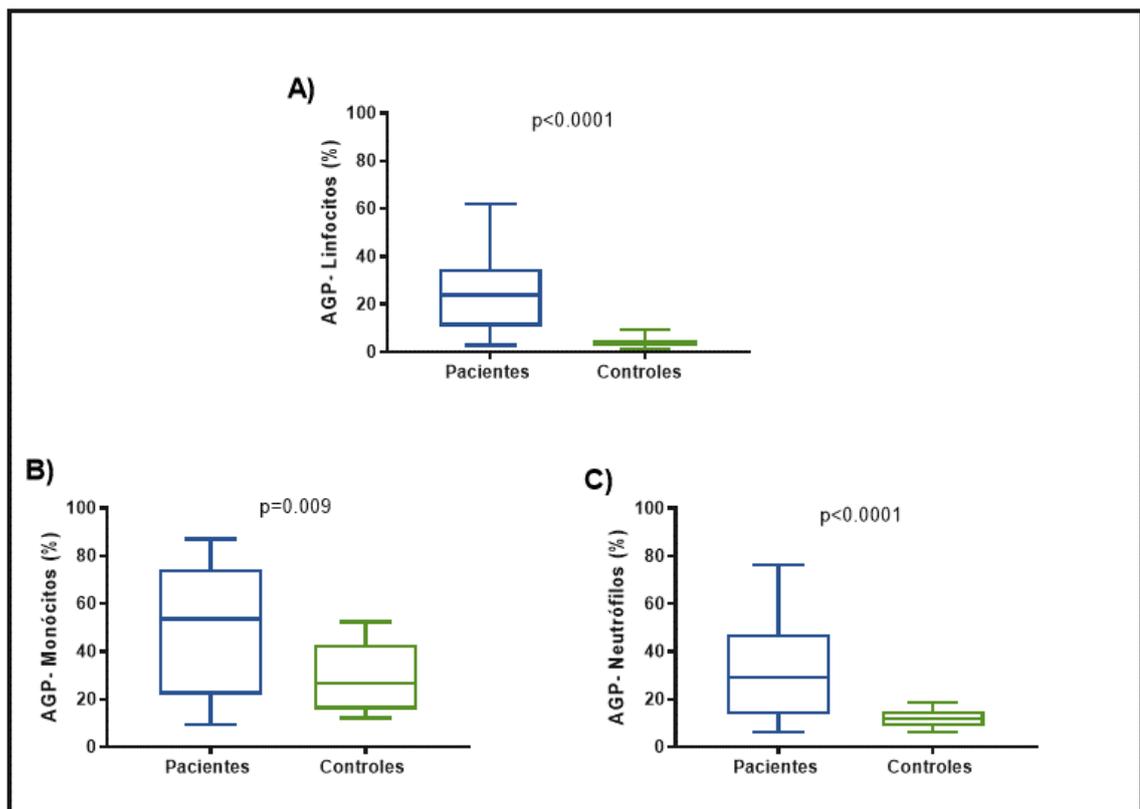
#### **4.4 ANÁLISES DOS AGREGADOS PLAQUETAS-LINFÓCITOS, PLAQUETAS-MONÓCITOS E PLAQUETAS-NEUTRÓFILOS**

- **Entre os pacientes e controles**

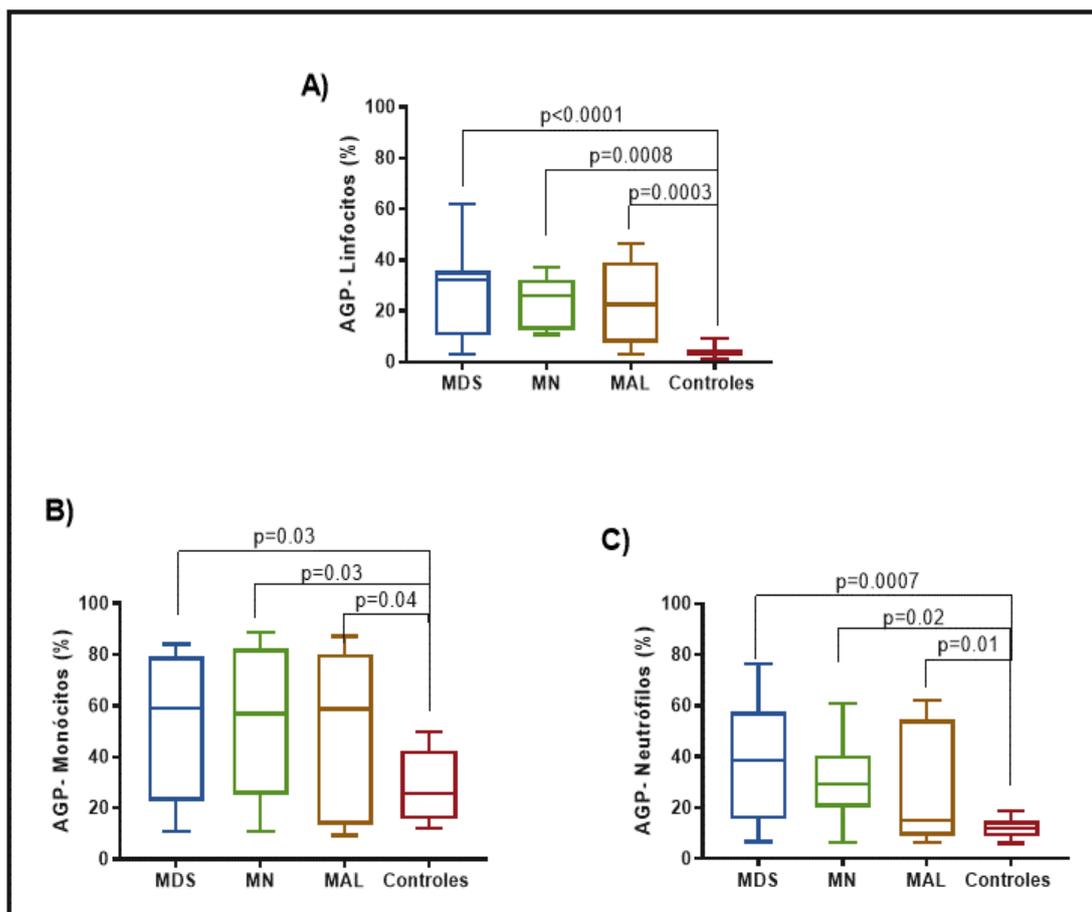
Foram observados elevados níveis percentuais dos agregados plaquetas-linfócitos (AGP-Linfócitos), plaquetas-monócitos (AGP-Monócitos) e plaquetas-neutrófilos (AGP-Neutrófilos) nos pacientes quando comparados aos controles ( $p < 0,05$ ) (Figura 26).

- **Entre os grupos de pacientes com tipos histológicos diferentes e os controles**

Foram observados elevados níveis percentuais dos agregados plaquetas-linfócitos (AGP-Linfócitos), plaquetas-monócitos (AGP-Monócitos) e plaquetas-neutrófilos (AGP-Neutrófilos) nos pacientes com melanoma cutâneo dos tipos melanoma disseminativo superficial (MDS), melanoma nodular (MN) e melanoma acral lentiginoso (MAL) quando comparados aos controles ( $p < 0,05$ ). Porém, não foram observadas diferenças significativas desses agregados entre os tipos de melanoma cutâneo (Figura 27).



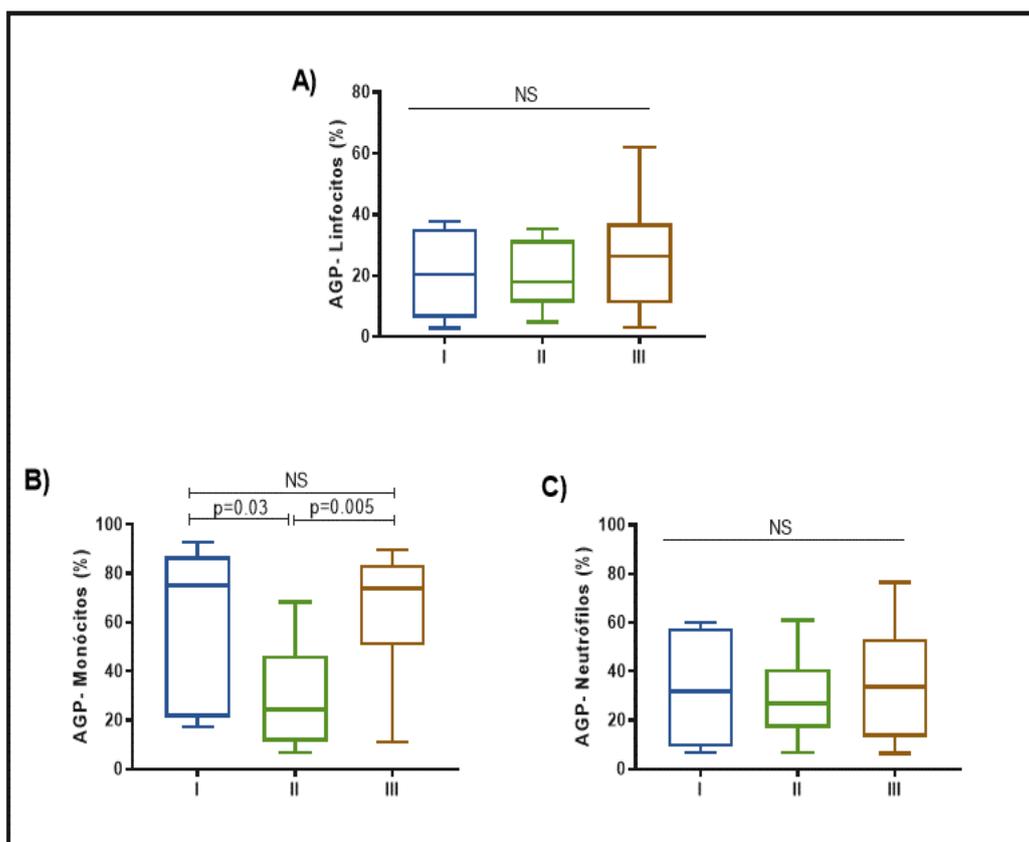
**Figura 26** - Níveis percentuais dos agregados plaquetas-linfócitos (AGP-Linfócitos), plaquetas-monócitos (AGP-Monócitos) e plaquetas-neutrófilos (AGP-Neutrófilos) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo e controles. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.



**Figura 27** - Níveis percentuais dos agregados plaquetas-linfócitos (AGP-Linfócitos), plaquetas-monócitos (AGP-Monócitos) e plaquetas-neutrófilos (AGP-Neutrófilos) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo dos tipos, melanoma disseminativo superficial (MDS), melanoma nodular (MN), melanoma acral lentiginoso (MAL) e de controles. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

- **Entre os grupos de pacientes com estádios I, II e III da doença**

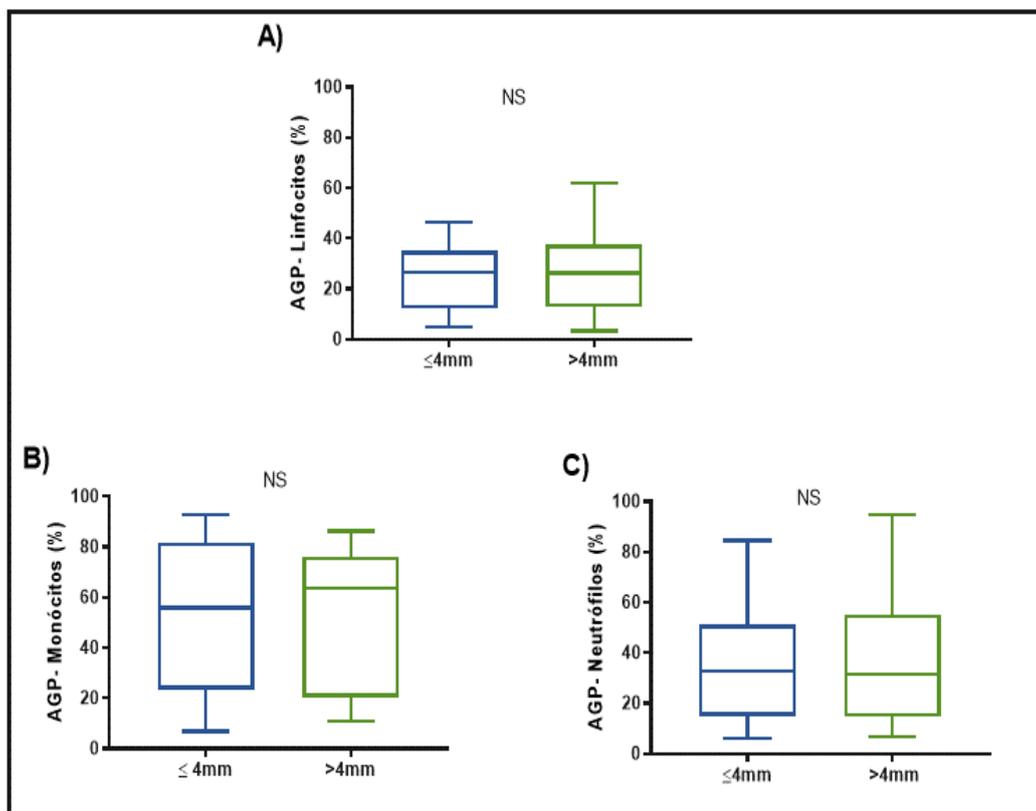
Não foram observadas diferenças significativas níveis percentuais dos agregados plaquetas-linfócitos (AGP-Linfócitos) e plaquetas-neutrófilos (AGP-Neutrófilos) entre os estádios I, II e III da doença. Houve diminuição estatisticamente significativa no estadio II quando comparada aos estádios I e III nos agregados plaquetas-monócitos (AGP-Monócitos) (Figura 28).



**Figura 28** - Níveis percentuais dos agregados plaquetas-linfócitos (AGP-Linfócitos), plaquetas-monócitos (AGP-Monócitos) e plaquetas-neutrófilos (AGP-Neutrófilos) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo estratificados por estádios I, II e III. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

- **Entre os grupos de pacientes com Breslow  $\leq 4$  mm ou  $> 4$  mm.**

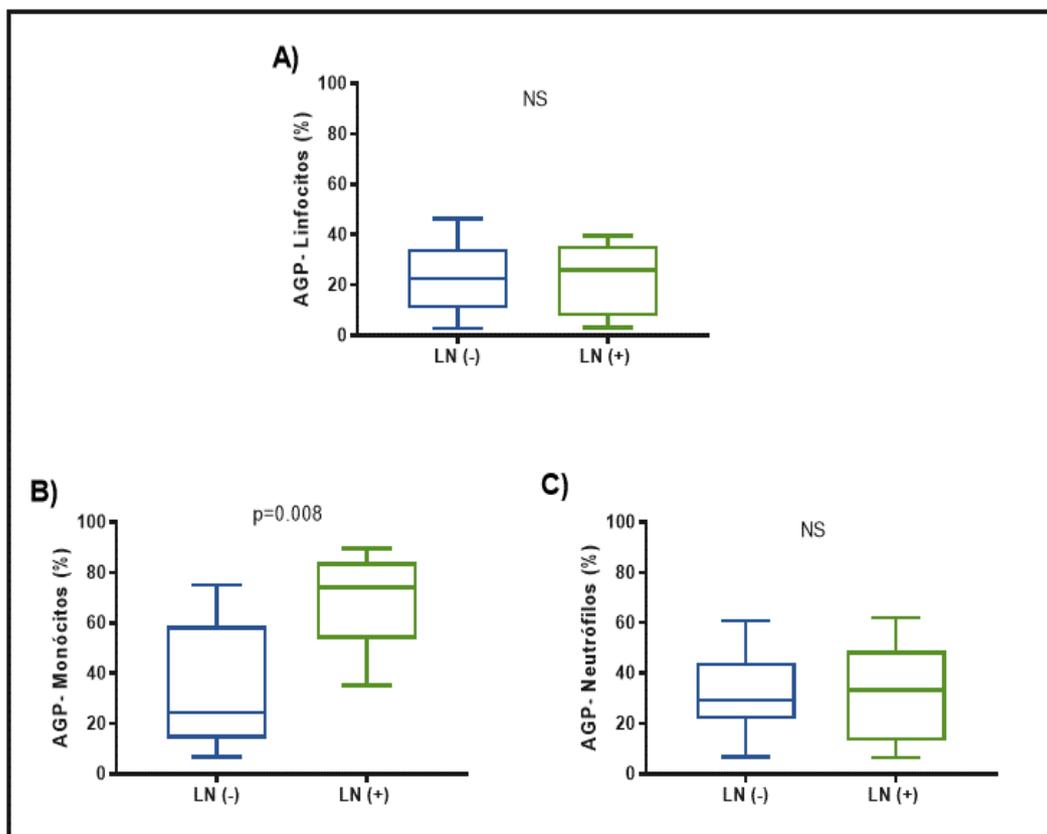
Não foram observadas diferenças significativas nos níveis percentuais dos agregados plaquetas-linfócitos (AGP-Linfócitos), plaquetas-monócitos (AGP-Monócitos) e plaquetas-neutrófilos (AGP-Neutrófilos) entre os grupos com espessuras de Breslow  $\leq 4$  mm ou  $> 4$  mm (Figura 29).



**Figura 29** - Níveis percentuais dos agregados plaquetas-linfócitos (AGP-Linfócitos), plaquetas-monócitos (AGP-Monócitos) e plaquetas-neutrófilos (AGP-Neutrófilos) no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo e com espessuras de Breslow  $\leq 4\text{mm}$  ou  $> 4\text{mm}$ . Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

- **Entre os grupos de pacientes com linfonodos positivos (LN+) e linfonodos negativos (LN -)**

Foram observados elevados níveis percentuais de AGP-Monócitos no grupo de pacientes com LN (+) quando comparado ao grupo LN (-) ( $p=0,008$ ). Porém, não foram observadas diferenças significativas AGP-Linfócitos e AGP-Neutrófilos entre os grupos (Figura 30).



**Figura 30** - Níveis percentuais dos agregados plaquetas-linfócitos (AGP-Linfócitos), plaquetas-monócitos (AGP-Monócitos) e plaquetas-neutrófilos (AGP-Neutrófilos) no sangue de pacientes com melanoma cutâneo e linfonodos positivos (LN+) e negativos (LN-). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

#### 4.5 ANÁLISES DOS NÍVEIS SOLÚVEIS DE CD40L (sCD40L) E sCD62P (P-SELECTINA)

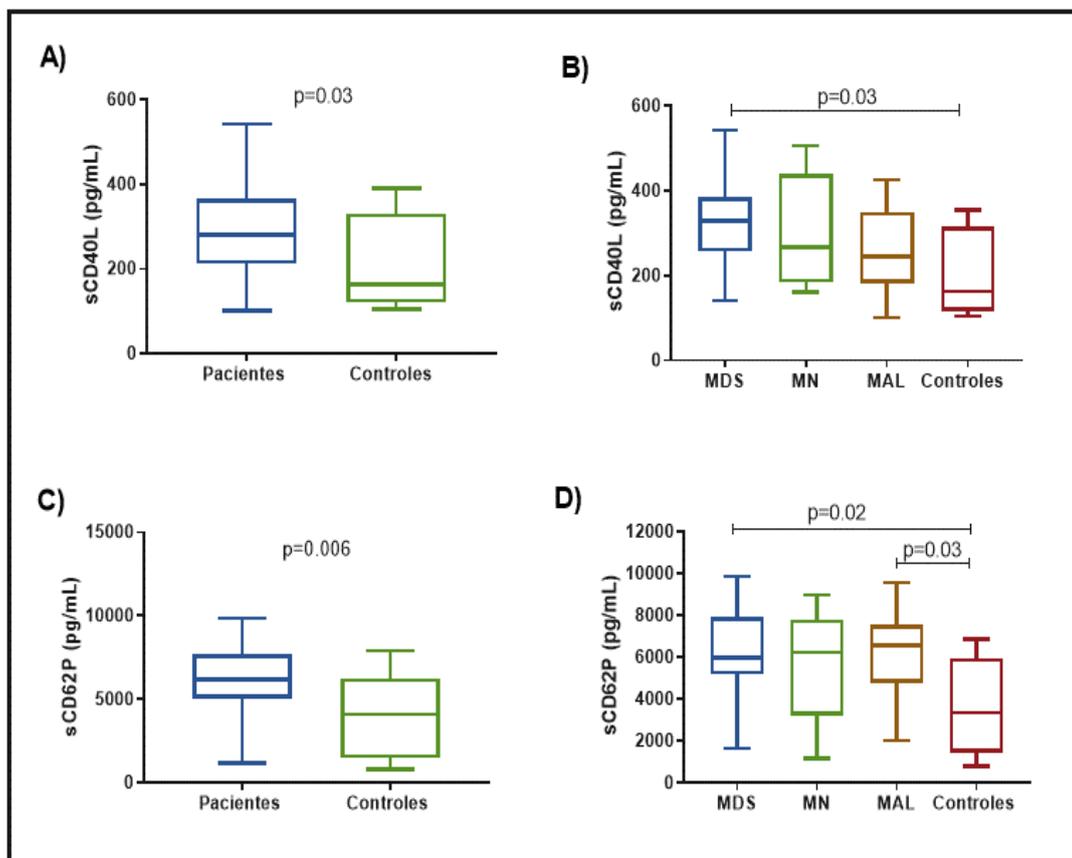
A agregação plaquetas-leucócitos pode promover a ativação plaquetária com produção e liberação de mediadores solúveis no plasma como sCD40L e sCD62P. Como foram observadas alterações de agregados plaquetários nos pacientes, as análises desses mediadores tiveram como propósito identificar possíveis biomarcadores no melanoma cutâneo.

- **Entre os pacientes e controles**

Foram observados elevados níveis de sCD40L e sCD62P nos pacientes quando comparados aos controles ( $p=0,03$  e  $p=0,006$ , respectivamente).

- **Entre os grupos de pacientes com tipos histológicos diferentes e os controles**

Foram observados elevados níveis de sCD40L e sCD62P nos pacientes com melanoma cutâneo MDS, e de apenas sCD62P no MAL quando comparados aos controles ( $p<0,05$ ). Porém, não foram observadas diferenças significativas de sCD40L e sCD62P entre MN e controles (Figura 31).



**Figura 31** - Níveis solúveis (pg/mL) de sCD40L e sCD62P no sangue periférico dos pacientes com melanoma e dos controles. Realizada estratificação dos tipos de melanoma, melanoma disseminativo superficial (MDS), melanoma nodular (MN), melanoma acral lentiginoso (MAL) e de controles. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%). Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

- **Entre os grupos de pacientes com estádios I, II e III da doença**

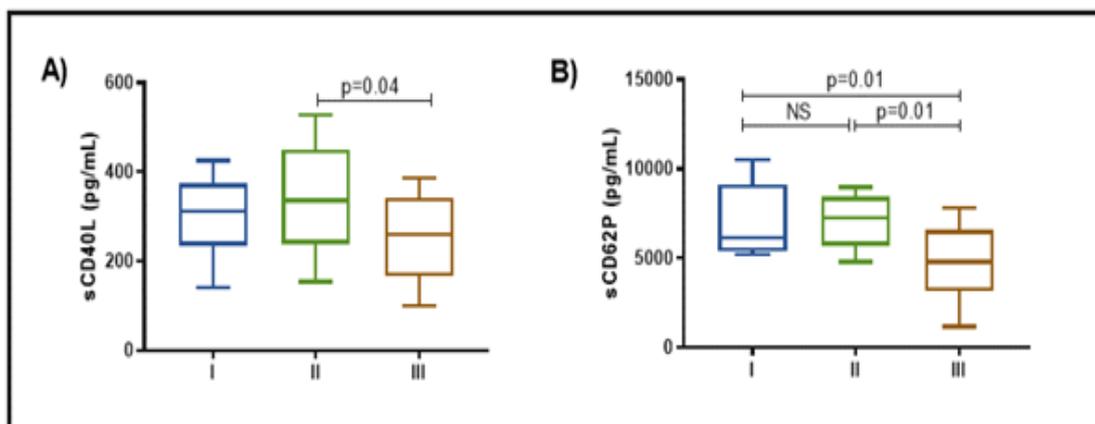
Foram observados níveis elevados de sCD40L nos pacientes com estágio II comparado ao grupo com estágio III ( $p=0,04$ ). Foram observados níveis elevados de sCD62P nos pacientes com estádios I e II quando comparados ao grupo com estágio III ( $p=0,01$ ) (Figura 32).

- **Entre os grupos de pacientes com Breslow  $\leq 4$  mm ou  $> 4$  mm.**

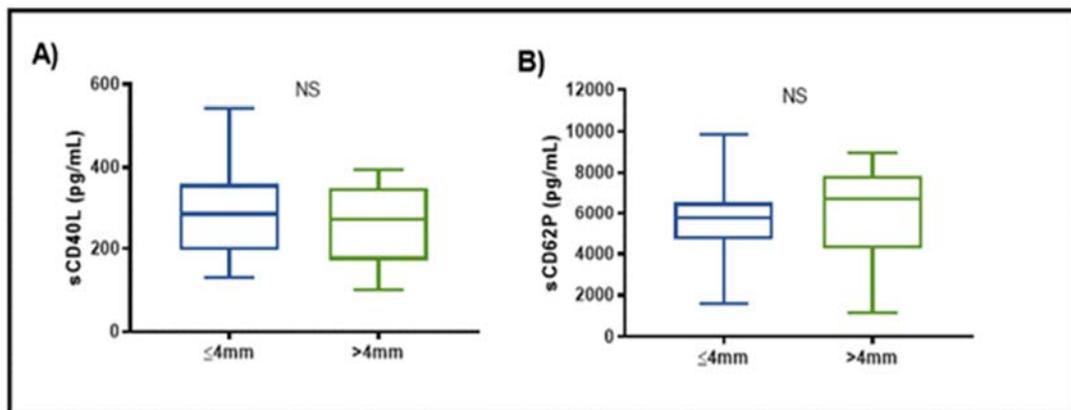
Não foram observadas diferenças significativas dos níveis solúveis de sCD40L e sCD62P entre os grupos com espessuras de Breslow  $\leq 4$ mm ou  $> 4$ mm (Figura 33).

- **Entre os grupos de pacientes com linfonodos positivos (LN+) e linfonodos negativos (LN-)**

Foram observados níveis elevados de sCD62P no grupo de pacientes com LN (-) quando comparado ao grupo LN (+) ( $p=0,001$ ). Porém, não foram observadas diferenças significativas dos níveis sCD40L entre os grupos (Figura 34).

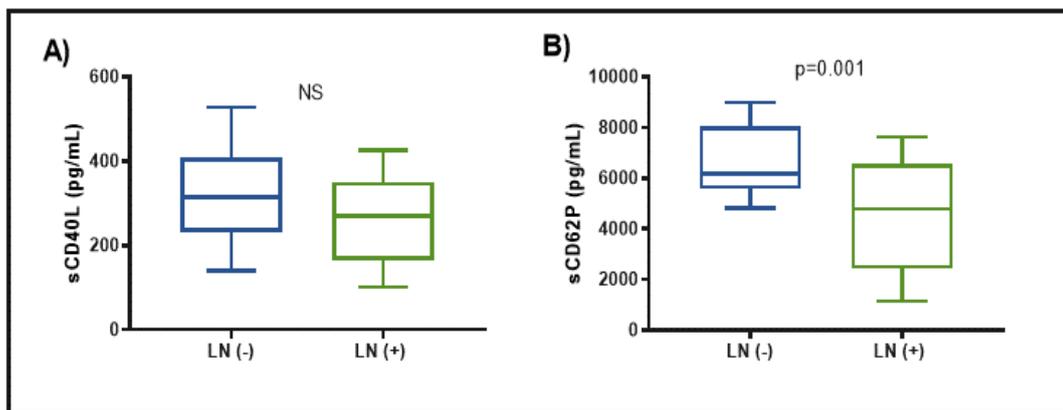


**Figura 32** - Níveis solúveis (pg/mL) de sCD40L e sCD62P no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo estratificados por estádios I, II e III. \*Foi considerado significativo  $p<0,05$ . NS: não significativo.



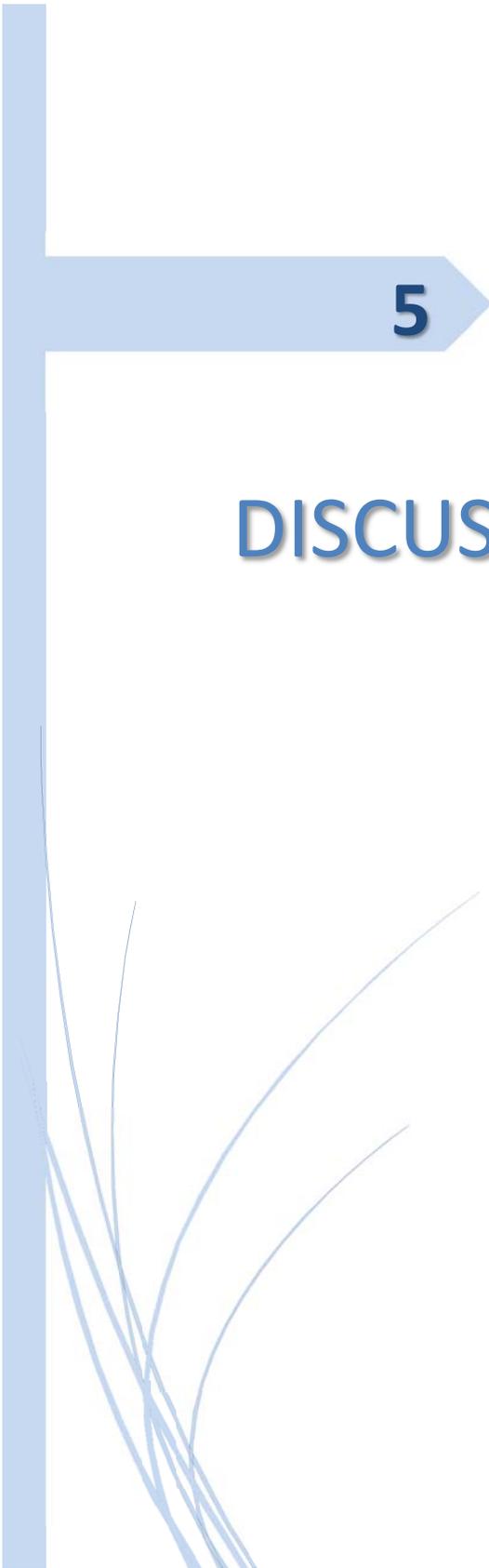
**Figura 33** - Níveis solúveis (pg/mL) de sCD40L e sCD62P no sangue periférico dos pacientes com melanoma cutâneo e com espessuras de Breslow  $\leq 4\text{mm}$  ou  $> 4\text{mm}$ .

\*Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.



**Figura 34** - Níveis solúveis (pg/mL) de sCD40L e sCD62P no sangue de pacientes com melanoma cutâneo e linfonodos positivos (LN+) e negativos (LN-). \*Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

**\*Todos os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25–75%).**



5

# DISCUSSÃO

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliados os pacientes com melanoma cutâneo atendidos no Hospital de Câncer de Pernambuco, sendo o primeiro estudo desenvolvido no HCP com análises de alguns mecanismos do sistema imune, como produção de mediadores como citocinas, quimiocinas, sCD40L, sCD62P e de agregados plaquetas-leucócitos no sangue venoso. O HCP é responsável pelo atendimento de 55% dos pacientes com câncer do estado de Pernambuco, sendo um hospital que atende exclusivamente a usuários do Sistema Único de Saúde (SUS).

Foram incluídos 51 pacientes com média de idade de 57,6 anos, sendo a maioria do sexo feminino. Essa maior prevalência da doença em mulheres está de acordo com os dados do INCA para o ano de 2018, mostrando uma incidência maior de melanoma cutâneo no sexo feminino (Ministério da Saúde 2018). Com relação à idade, diferente de outros tumores sólidos, o melanoma afeta principalmente indivíduos jovens e de meia-idade (idade mediana no diagnóstico, 57 anos). A incidência aumenta linearmente após 25 anos até 50 anos de idade, e depois diminui, particularmente no sexo feminino. Ao analisar dados de incidência em relação ao sexo, mulheres são mais frequentes em grupos mais jovens, enquanto o sexo masculino prevalece a partir dos 55 anos (RASTRELLI et al. 2014).

A maioria dos pacientes se identificou como de cor de pele branca, sendo o melanoma cutâneo mais prevalente na população caucasiana pela sua sensibilidade à exposição crônica ou intermitente à radiação ultravioleta solar, levando em conta também, a origem da população estudada (CANDIDO et al. 2014). Com relação ao

diagnóstico, verificou-se uma maior frequência de pacientes em fase avançada da doença, com maior prevalência do estadió III. De acordo com a literatura, o melanoma tem uma tendência para metastatizar mesmo nos estadios mais iniciais da tumorigênese, em grande parte devido à sua natureza altamente agressiva (SOSMAN et al. 2012). No Brasil, a dificuldade do acesso aos serviços de saúde de referência pode ser uma das causas do maior número de pacientes com diagnóstico avançado da doença. Outra explicação, é que os pacientes com melanoma em estágios iniciais são frequentemente assintomáticos e, portanto, o diagnóstico é realizado de forma tardia na grande maioria dos países ocidentais (SOSMAN et al. 2012).

Por isso, apesar dos resultados clínicos encorajadores das novas terapias, o prognóstico ainda é ruim, e está associado as características histopatológicas do tumor primário ao diagnóstico, incluindo a espessura de Breslow, status linfonodal, estadió da doença e tipo histológico. A interação das células do melanoma com as células do sistema imune inato e adaptativo está direta ou indiretamente associada a sobrevivência e invasão tumoral (BEUTLER 1999; GRIFFIN et al. 2012).

Nesse contexto, avaliou-se neste estudo o perfil de citocinas pró-inflamatórias (IL6 e TNF $\alpha$ ) e anti-inflamatória (IL10) nos pacientes. Foram observados níveis séricos diminuídos de TNF $\alpha$  e elevados de IL10 nos pacientes quando comparados aos controles. TNF $\alpha$  é uma glicoproteína que foi inicialmente descrita por sua capacidade para induzir necrose em certos tumores. Porém, essa citocina é produzida por monócitos/macrófagos na fase aguda do processo inflamatório, sendo um dos principais mediadores do choque séptico. No fígado, estimula a resposta inflamatória aguda elevando a síntese de proteína C reativa e outros mediadores (BEUTLER 1999; GRIFFIN et al. 2012).

O TNF induz vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular, o que é propício para a infiltração de linfócitos, neutrófilos e monócitos. Ela ajuda a recrutar essas células para o local da inflamação, regulando produção de quimiocinas (BEUTLER 1999; GRIFFIN et al. 2012). Isso sugere que os baixos níveis de TNF $\alpha$  encontrados nos pacientes devem estar associados ao processo inflamatório crônico, pois a maioria dos nossos pacientes apresentavam estadios mais avançados da doença. Apesar do TNF $\alpha$  ser uma citocina reconhecida como pró-inflamatória, seu real efeito sobre o microambiente tumoral ainda não está totalmente estabelecido (AGGARWAL et al. 2016). Um estudo Europeu multicêntrico com mais de 130.000 pacientes com artrite reumatóide em uso de anticorpo anti-TNF $\alpha$  mostrou que não existe uma associação clara entre o bloqueio de TNF e o risco de desenvolvimento de melanoma cutâneo (MERCER et al. 2017). Foi relatado uma associação de drogas que bloqueiam o TNF $\alpha$  com o câncer de pele não melanoma (especialmente carcinoma espinocelular), mas a associação com melanoma ainda não foi esclarecida (NARDONE et al. 2018).

O TNF $\alpha$  é uma citocina importante para resposta inflamatória e está relacionada em muitos estudos com efeitos antineoplásicos por induzir resposta imunológica anti-tumoral (GRUNHAGEN et al. 2004). Mas como IL10, os efeitos TNF $\alpha$  parecem depender da sua concentração e dos alvos celulares no microambiente tumoral. A citocina IL10 parece ter um papel fundamental na biologia do câncer, por ser uma citocina imunoreguladora, e portanto, estaria envolvida com a imunossupressão quando produzida no microambiente tumoral na fase crônica da doença, favorecendo o crescimento das células neoplásicas (BOYANO et al. 2000; GERLINI et al. 2004).

Em 1994, KRÜGER-KRASAGAKES et al, já tinham demonstrado que as células do melanoma produzem elevados níveis de IL10 (KRÜGER-KRASAGAKIS et al. 1994). Por sua vez, DUMMER et al. (1996) demonstraram um aumento dos níveis de IL10 nos melanomas primários e com focos metastáticos quando comparados aos melanócitos da pele normal e à lesões melanocíticas benignas, e que essa produção poderia ser preditiva do prognóstico (DUMMER et al. 1996). Outros autores também demonstraram que os níveis séricos de IL10 foram mais elevados nos pacientes com melanoma metastático e estariam associados à inibição de células apresentadoras de antígeno (células dendríticas) no microambiente tumoral, sendo correlacionados ao pior prognóstico (BOYANO et al. 2000; GERLINI et al. 2004). Neste estudo, também verificamos aumento significativo de IL10 nos nossos pacientes com melanoma em comparação aos controles. TORISO-ITAKURA et al. (2007) também evidenciaram um aumento de IL10 em pacientes com melanoma, sendo associado ao pior prognóstico. Esses autores mostraram que os níveis elevados de IL10 no melanoma eram decorrentes da sua produção por monócitos/macrófagos (TORISU-ITAKURA et al. 2007).

Quando comparamos os níveis de IL10 dos pacientes por tipo histológico, Breslow, estadió e presença de linfonodos positivos, identificamos diferença significativa apenas para o grupo de pacientes com tipo histológico disseminativo superficial que apresentou níveis mais elevados. Dos quatro principais tipos de melanoma, o disseminativo superficial e o lentigo maligno-melanoma têm as melhores taxas de sobrevivência, enquanto o melanoma nodular é considerado o de pior prognóstico. No entanto, quando as taxas são ajustadas pela espessura do tumor, não há diferença significativa de sobrevivência em 10 anos entre o melanoma disseminativo superficial e

nodular. O melhor prognóstico associado aos melanomas disseminativo superficial, portanto, parece estar relacionado ao fato da espessura do Breslow no momento do diagnóstico. Os melanomas do tipo lentigo maligno, por outro lado, têm um prognóstico melhor do que os outros padrões de crescimento, mesmo quando pareados por espessura (URIST et al. 1984).

Apesar de não observarmos diferença significativa nos níveis de IL6 entre os pacientes com melanoma comparados aos controles, verificou-se que o valor de mediana de IL6 foi maior nos pacientes. Alguns autores descreveram a produção elevada de IL6 por células de melanoma, e associaram essa elevação ao pior prognóstico (SOUBRANE et al. 2005; KUCERA et al. 2015; LINNSKOG et al. 2016). Dentro do microambiente tumoral, a produção de IL6 é geralmente considerada pior para a resposta anti-tumoral, estando associada a progressão do tumor. A produção de IL6 está diretamente envolvida na tumorigênese, pois células tumorais podem ser favorecidas pela ação autócrina dessa citocina e que junto a outros mediadores inflamatórios pode aumentar a proliferação, a sobrevivência e a disseminação metastática dessas células. Além disso, a IL6 pode agir de forma parácrina, atuando em outras células no microambiente tumoral, favorecendo a angiogênese e a evasão tumoral da vigilância imunológica (FISHER et al. 2014).

Algumas funções da IL6 no câncer são pouco conhecidas. Essa citocina desempenha um papel indispensável na circulação de células T entre os linfonodos e o infiltrado tumoral, pois aumenta a expressão de moléculas de adesão no endotélio, promovendo a transmigração dessas células com funções efetoras citotóxicas (FISHER et al. 2014). A IL6 é fundamental para a ativação, proliferação e sobrevivência de linfócitos durante a resposta imune. É capaz de promover a ativação

de linfócitos T nos órgãos linfóides, potencializando a resposta imune celular contra as células tumorais. Além disso, BHANUMATHY et al. (2014) em um modelo de vacina com células dendríticas modificadas geneticamente com produção aumentada de IL6, observaram que essas células quando inoculadas nos camundongos com melanoma, produziam uma significativa redução de células T reguladoras com aumento da ativação das células TCD8<sup>+</sup>, cuja principal função é promover a morte de células tumorais. Esses dados corroboraram os nossos resultados, pois verificamos um aumento de IL6 no grupo de pacientes com linfonodos negativos, podendo estar associado à uma melhor sobrevida. É importante ressaltar que não avaliamos células de melanoma *in vitro*. As análises foram realizadas no sangue, cuja maioria das células são leucócitos circulantes, espelhando o microambiente tumoral.

A migração de leucócitos para os tecidos é fundamental para manutenção da homeostase do organismo e faz parte da fisiologia do sistema imune. Nos tumores sólidos ocorre a migração de células do sangue para o infiltrado tumoral, sendo essas células principalmente compostas por linfócitos e monócitos (MANTOVANI et al. 1992). A infiltração de células do sistema imune no tecido tumoral é regulada por quimiocinas derivadas do próprio microambiente tumoral (MANTOVANI et al. 1992).

Dentre os mediadores quimiotáticos estudados, verificamos níveis diminuídos de CCL5 (RANTES) no sangue dos pacientes em comparação com os controles. O CCL5 é produzido por linfócitos T, macrófagos, plaquetas, fibroblastos, epitélio e certos tipos de células tumorais. Ativação de NF- $\kappa$ B por diferentes estímulos, como CD40L ou IL15, induz a produção de CCL5. A CCL5 promove o recrutamento de uma

vários leucócitos para locais com processo inflamatório, incluindo células T, macrófagos, eosinófilos e basófilos (ALDINUCCI e COLOMBATTI 2014).

Em colaboração com algumas citocinas liberadas pelas células T (IL2 e IFN- $\gamma$ ), a CCL5 também induz a ativação e proliferação de linfócitos TCD8<sup>+</sup> citotóxicos e de células NK, sendo as principais células efetoras anti-tumorais. Como a análise foi realizada no sangue dos pacientes, a produção de CCL5 foi oriunda de leucócitos circulantes, e os baixos níveis encontrados podem estar associados aos mecanismos de escape tumoral (MROWIETZ et al. 1999).

A CCL5 pode ser produzida por células do melanoma, sendo a sua expressão de 5 a 50 vezes maior que CXCL8, sendo regulada pelo TNF $\alpha$ . As células do melanoma que expressavam níveis elevados de CCL5 foram mais agressivas. Os tumores que expressam CCL5 são altamente quimiotáticos para leucócitos, e isso favorece a progressão tumoral (MROWIETZ et al. 1999). As interações de CCL5 com o seu receptor CCR5 podem favorecer o desenvolvimento de tumores de múltiplas formas: i) atuando como fatores de crescimento, estimulando a angiogênese, ii) modulando a matriz extracelular, iii) induzindo recrutamento de células estromais e inflamatórias adicionais, iv) participando de mecanismos de evasão imune (ALDINUCCI e COLOMBATTI 2014).

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis IP10/CXCL10, MCP-1/CCL2, MIG/CXCL9, e de IL8/CXCL8 entre os pacientes e controles. Apesar dessas quimiocinas estarem associadas a metástase e angiogênese tumoral, também não observamos diferenças significativas no grupo de pacientes com doença mais avançada. Por sua vez, CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1 e CXCL8/IL8 são quimiocinas também produzidas pelas plaquetas durante a ativação da resposta imune, estando

envolvidas na migração de linfócitos, monócitos e neutrófilos, respectivamente (GAY e FELDING-HABERMANN 2011).

Com o objetivo de mostrar a associação da diminuição dos níveis de CCL5 encontradas nos pacientes com produção de IL6 aumentada nos pacientes com linfonodos negativos, decidimos analisar o envolvimento dos agregados plaquetas-leucócitos no melanoma. A ativação das plaquetas pelas células do tumor e sua agregação, contribuem para o aumento da angiogênese no microambiente tumoral, sobrevivência das células tumorais na corrente sanguínea, adesão e interação com o endotélio de órgãos alvos de metástases (GAY e FELDING-HABERMANN 2011).

Na análise realizada nos pacientes, foi possível mostrar um aumento dos agregados de plaquetas-linfócitos, plaquetas-monócitos e plaquetas-neutrófilos quando comparada aos controles. Também verificamos que o grupo de pacientes com linfonodos positivos apresentou níveis elevados dos agregados de plaquetas-monócitos comparado ao grupo dos pacientes com linfonodos negativos. Essa agregação está relacionada com o grau de ativação das plaquetas pelas células tumorais, confirmada pelos níveis solúveis elevados sCD40L e sCD62P nos pacientes com melanoma comparado aos controles. Em um estudo com cultura de células mononucleares, foi demonstrado que as plaquetas ativadas aumentam a expressão de CD40L. Por sua vez, o CD40L induz a produção de IL10 e inibe a de TNF $\alpha$  pelos monócitos, devido a interação do CD40L das plaquetas com o CD40 expresso nos macrófagos ativados (GUDBRANDSDOTTIR et al. 2013). Nossos dados corroboram esses resultados, já que, além do aumento dos agregados de plaquetas-leucócitos, os pacientes também apresentaram níveis elevados de CD40L no sangue, aumento significativo de IL10 e baixos níveis de TNF $\alpha$ .

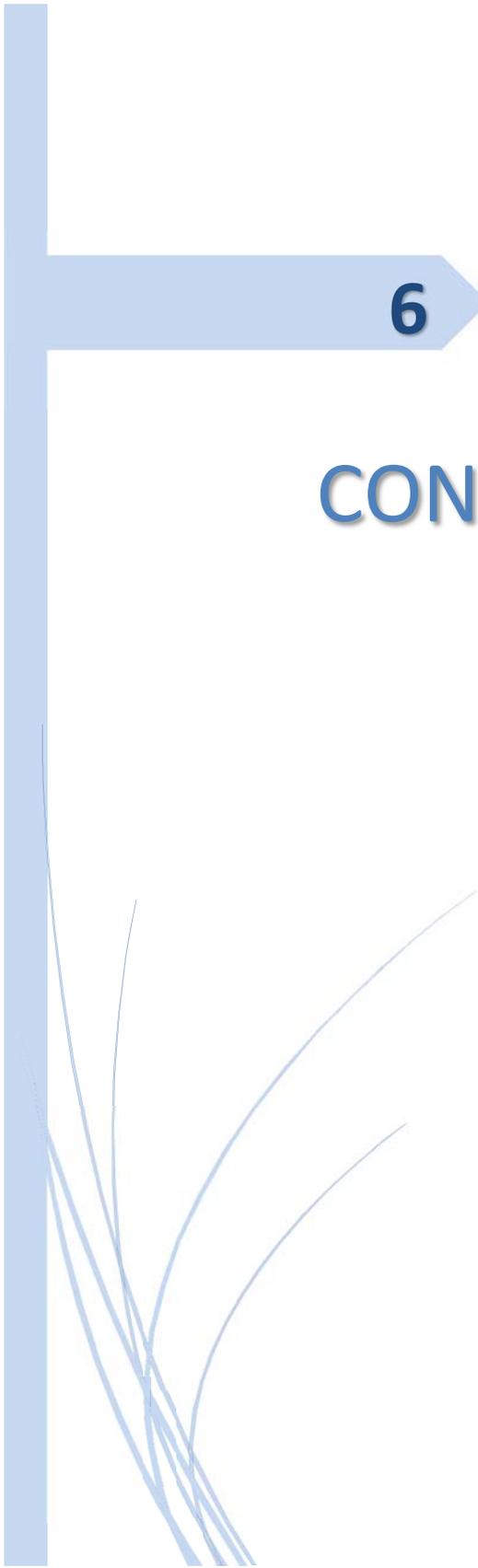
Porém, o contrário ocorreu na análise da associação de CD62P com os parâmetros histopatológicos que mostrou níveis reduzidos de sCD62P no grupo de pacientes com estadio III e linfonodos positivos. Em 1998, NOOIJEN et al. relataram que alguns tumores malignos induzem uma resposta imune celular que resulta na formação de um infiltrado inflamatório e subsequente regressão tumoral. Os leucócitos migram do sangue para os tecidos após sua ligação aos receptores de adesão na superfície do endotélio. Um desses receptores é a molécula de CD62P (P-selectina) que está constitutivamente presente no endotélio vascular. Esses autores mostraram que a expressão da CD62P está ausente na microvasculatura no melanoma primário avançado e na metástase do melanoma, em contraste com as lesões melanocíticas benignas, onde a expressão do CD62P era idêntica à da pele normal. Eles sugeriram que um dos mecanismos pelos quais as lesões avançadas de melanoma evadem da resposta imune é a baixa expressão de CD62P no endotélio vascular.

Entre as proteínas de ativação das plaquetas, a P-selectina (CD62P) é a mais conhecida, sendo expressa na membrana plasmática de plaquetas ativadas e também de células endoteliais, sendo uma das principais moléculas de adesão e ativação dos agregados plaquetários. É considerada o marcador "padrão de ouro" de ativação da plaqueta *in vitro*, já que a expressão dessa molécula na superfície das plaquetas não é reversível ao longo do tempo. O CD62P é capaz de se ligar aos leucócitos e a várias linhagens tumorais, tais como foram mostradas no câncer do cólon. Também aumenta a deposição de plaquetas no microambiente tumoral com elevação de VEGF e aumento de angiogênese, contribuindo para o processo metastático em modelos animais de melanoma (QI et al. 2015). A produção de CD62P solúvel (sCD62P) ocorre pela clivagem dessa molécula da membrana das plaquetas e do endotélio, elevando-se

assim seus níveis séricos (solúveis). Porém, o aumento dos agregados de plaquetas-leucócitos e plaquetas-endotélio podem resultar em níveis reduzidos dessas moléculas solúveis no sangue, devido à redução dos níveis de CD62P livres nas membranas plaquetárias e endoteliais por consumo nos agregados (MICHELSON et al. 2001; DOPHEIDE et al. 2016).

O aumento da agregação plaquetária em linfócitos, monócitos e neutrófilos nos pacientes com melanoma demonstra um ambiente propício para o processo metastático. Não encontramos estudos na literatura até o momento que avaliem em conjunto os mecanismos mostrados neste trabalho. Embora não seja possível utilizar os dados de agregação plaquetária como fator prognóstico, podemos afirmar que o melanoma tem o potencial de aumentar agregação e ativação plaquetárias, provavelmente contribuindo para um efeito adverso na evolução da doença.

A ativação de respostas imunes anti-tumorais por meio da imunoterapia está revolucionando a maneira como tratamos o câncer. Devido à suas características imunológicas, o melanoma é um dos tumores que se beneficiaria da imunoterapia devido principalmente à sua carga antigênica. De fato, análises genômicas e transcriptômicas de respondedores e não respondedores ao tratamento apoiam uma complexa rede de interações, na qual células tumorais e imunes estão continuamente evoluindo em ecossistemas, deslocando o equilíbrio para ativação ou imunossupressão. Com estudos como este, começamos a entender os processos biológicos exibidos pelo tumor no escape da imunovigilância e das vias de sinalização dos fatores de transcrição responsáveis por esses processos. No futuro, a imunoterapia em conjunto com o controle dos mecanismos de escape tumorais, deve resultar em melhores resultados clínicos.



6

## CONCLUSÃO

## 6 CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível concluir que os pacientes com melanoma cutâneo apresentam um perfil imunossupressor, demonstrado pelos níveis elevados de IL10, associado aos níveis diminuídos de CCL5 e TNF $\alpha$ , podendo favorecer a progressão tumoral por atuarem como fatores de crescimento e estimulando a angiogênese. Os maiores níveis de IL6 circulantes no grupo de pacientes com linfonodos negativos mostram que essa citocina no melanoma pode estar associada a um melhor prognóstico.

As quimiocinas CXCL10/IP10, CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG, e de CXCL8/IL8 produzidas pelos leucócitos circulantes mostraram não estar envolvidas na tumorigênese do melanoma cutâneo, porém, ainda é necessário realizar ensaios *in vitro* com as células do tumor para comparar a produção dessas quimiocinas entre o sangue e microambiente tumoral.

A presença de níveis elevados de agregados de plaquetas-leucócitos e de mediadores solúveis sCD40L e sCD62P, envolvidos com ativação plaqueta – endotélio, demonstram um mecanismo associado a progressão e metástases no melanoma.

O aumento de agregado plaquetas-monócitos e a redução dos níveis de CD62P solúveis nos pacientes com linfonodos positivos pode inferir que as interações entre monócitos e plaquetas (seja via receptores de CD62P), e que infiltração de macrófagos/monócitos ao melanoma invasivo pode ser crítica para a progressão dos melanomas com fenótipo mais agressivo.

É importante ressaltar que as complexas interações entre as células do sistema imune e as células do melanoma podem levar a identificação de biomarcadores que ajudem a identificar micrometástases nos pacientes e também possibilitar o desenvolvimento de novas terapias direcionadas ao sistema imune, incluindo as plaquetas.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal B, Gupta SC, Kim JH. Review article Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily : 25 years later , a golden journey. **Blood** 2012; 119:651-65.

Aldinucci D, Colombatti A. The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. **Mediators Inflamm** 2014; 2014:292376.

Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature** 2013; 500:415-21.

Arango DG, Fucuda M, Descoteaux A. Synaptotagmin XI regulates phagocytosis and cytokine secretion in macrophages. **J Immunol** 2013; 190:1737-45.

Atsumi T, Singh R, Sabharwal L, et al. Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. **Cancer Res** 2014; 74:8-14.

Balkwill F. Cancer and the chemokine network. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:540-50.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow. **Lancet** 2001; 357:539-45.

Bastian BC. The molecular Pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. **Annu Rev Pathol** 2014; 9:239-71.

Bauer J, Garbe C. Acquired melanocytic nevi as factor for melanoma development: a comprehensive review of epidemiological data. **Pigment Cell Res** 2003; 16:297-306.

BD, Biosciences, CA. **BD Accuri C6 flow cytometer instrument manual**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2kP8b6F>> [2019 jan 12]

Becker AK, Beckmann N, Adams C, et al. Melanoma cell metastasis via P-selectin-mediated activation of acid sphingomyelinase in platelets. **Clin Exp Metastasis** 2017; 34:25-35.

Berwick M, Erdei E, Hay J. Melanoma epidemiology and public Health. **Dermatol Clin** 2009; 27:1-14.

Beutler BA. The role of tumor necrosis factor in health and disease. **J Rheumatol** 1999; 57:16-21.

Bhanumathy KK, Zhang B, Ahmed KA, et al. Transgene IL-6 enhances DC-stimulated CTL responses by counteracting CD4+25+foxp3+ regulatory t cell suppression via IL-6-induced foxp3 downregulation. **Int J Mol Sci** 2014; 15:5508-21.

Bonardi R, Graciosa K, Melchiorreto E, Furlani LF, Sartor MC, Baldin A Jr. Trombocitose como fator prognóstico no câncer colorretal. **Rev Bras Colo-Proctol** 2010; 30:128-33.

Boniol M, Autier P, Boyle P, Gandini S. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: Systematic review and meta-analysis. **Br Med J** 2012; 345:1-12.

Bournazos S, Rennie J, Hart SP, Fox KA, Dransfield I. Monocyte functional responsiveness after PSGL-1-mediated platelet adhesion is dependent on platelet activation status. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2008; 28:1491-8.

Boyano MD, Garcia-Vázquez MD, López-Mivhelena T, et al. Soluble interleukin-2 receptor, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 serum levels in patients with melanoma. **Br J Cancer** 2000; 83:847-52.

Brady MS, Oliveira SA, Christos PJ, et al. Patterns of detection in patients with cutaneous melanoma. **Cancer** 2000; 89:342-37.

Braeuer RR, Watson IR, Wu CJ, et al. Why is melanoma so metastatic? **Pigmente Cell Melanoma Res** 2014; 27:19-36.

Bremer E. Targeting of the tumor necrosis factor receptor superfamily for cancer immunotherapy. **ISRN Oncol** 2013; 2013:371854.

Burnet FM. The concept of immunological surveillance. **Prog Exp Tumor Res** 1970; 13:1-27.

Cancer Genoma Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell** 2015; 161:1681-96.

Candido J, Hagemann T. Cancer-related inflammation. **J Clin Immunol** 2013; 33 Suppl 1:S79-84.

Candido S, Rapisarda V, Marconi A, et al. Analysis of the BRAF<sup>v600E</sup> mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure. **Oncol Rep** 2014; 32:1079-82.

Cascinelli N. Margin of resection in the management of primary melanoma. **Semin Surg Oncol** 1998; 14:272-75.

Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. **Immunity** 2013; 39:1-10.

Cohn-Cedermark G, Rutqvist LE, Andersson R, et al. Resection margins of 2 versus 5 cm for cutaneous malignant melanoma with a tumor thickness of 0.8 to 2.0 mm: a randomized study by the Swedish Melanoma Study Group. **Cancer** 2000; 89:1495-501.

Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **FASEB J** 2007; 21:976-94.

Cruvinel WM, Mesquita DJ, Araújo JA, et al. Immune system- part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Rev Bras Reumatol** 2010; 50:434-61.

Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **N Engl J Med** 2005; 355:2135-47.

Das S, Sarrou E, Podgrabinska S, et al. Tumor cell entry into the lymph node is controlled by CCL1 chemokine expressed by lymph node lymphatic sinuses. **J Exp Med** 2013; 210:1509-28.

Demierre MF, Chung C, Miller DR, Geller AC. Early detection of thick melanomas in the United States. **Arch Dermatol** 2005; 141:745-50.

Denardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. **Cancer Discovery** 2011; 1:54-67.

Dennis KL, Blatner NR, Gounari F, Khazaie K. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. **Curr Opin Oncol** 2013; 25:637-45.

Dessinioti C, Antoniou C, Katsambas A, Stratigos AJ. Melanocortin 1 receptor variants: functional role and pigmentary associations. **Photochemistr Photobiol** v2011; 87:978-87.

Dopheide JF, Rubrech J, Trumpp A, et al. Leukocyte-platelet aggregates phenotypic characterization of different stages of peripheral arterial disease. **Platelets** 2016; 27:658-67.

Dummer W, Bastian BC, Ernest N, Schänzle C, Schwaaf A, Bröcker EB. Interleukin-10 production in malignant melanoma: preferential detection of IL-10-secreting tumor cells in metastatic lesions. **Int J Cancer** 1996; 66:607-10.

Elder DE. Pathology of melanoma. **Surg Oncol Clin N Am** 2015; 24:229-37.

Emens LA, Reilly RT, Jaffee EM. Augmenting the potency of breast cancer vaccines: combined modality immunotherapy. **Breast Dis** 2004; 20:13-24.

Falzone L, Marconi A, Loreto C, Franco S, Spandidos DA, Libra M. Occupational exposure to carcinogens: Benzene, pesticides and fibers. **Mol Med Rep** 2016; 14:4467-74.

Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, et al. Completion dissection or observation for sentinel-node metastasis in melanoma. **N Engl J Med** 2017; 376:2211-22.

Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with <sup>125</sup>I-5-iodo-2'-deoxyuridine. **J Natl Cancer Inst** 1970; 45:773-82.

Finsterbusch M, Schrottmaier WC, Kral-Pointner JB, Salzmann M, Assinger A. Measuring and interpreting platelet-leucocyte aggregates. **Platelets** 2018; 29:677-85.

Fisher DT, Appenheimer MM, Evans SS. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. **Semin Immunol** 2014; 26:38-47.

Francken AB, Bastiaannet E, Hoekstra HJ. Follow-up in patients with localised primary cutaneous melanoma. **Lancet Oncol** 2005; 6:608-21.

Fridman WH, Galon J, Pagès F, Tartour E, Sautès-Fridman C, Kroemer G. Prognostic and predictive impact of intra and peritumoral immune infiltrates. **Cancer Res** 2011; 71:5601-5.

Fridman WH, Dieu-Nosjean MC, Pagès F, et al. The immune microenvironment of human tumors: General significance and clinical impact. **Cancer Microenviron** 2013; 6:117-22.

Gabellini C, Trisciuglio D, Desideri M, et al. Functional activity of CXCL8 receptors, CXCR1 and CXCR2, on human malignant melanoma progression. **Eur J Cancer** 2009; 45:2618-27.

Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. **Nat Rev Immunol** 2009;9:162-74.

Gachon J, Beaulieu P, François J, et al. First prospective study of the recognition process of melanoma in dermatological practice. **Arch Dermatol** 2005; 141:434-8.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. **Eur J Cancer** 2005; 41:28-44.

Garraud O, Cognasse F. Are platelets cells? And if yes, are they immune cells? **Front Immunol** 2015; 6:1-8.

Gay LJ, Felding-Habermann, B. Contribution of platelets to tumour metastasis. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:123-34.

Gerlini G, Tun-Kyi A, Dudli C, Burg G, Pimpinelli N, Nestle FO. Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions. **Am J Pathol** 2004; 165:1853-63.

Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, et al. Melanoma staging: evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. **CA Cancer J Clin** 2017a; 67:472-92.

Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, et al. **AJCC American Joint Committee on Cancer Cancer Staging Manual**. 8<sup>th</sup> ed. New York: Springer; 2017b. Melanoma; p.563-85.

Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. **N Eng J Med** 1999; 340:1341-8.

Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. **Genes Dev** 2000; 14:1693-711.

Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. **Genes Dev** 2018; 32:1267-84.

Goldstein AM, Tucker MA. Genetic epidemiology of cutaneous melanoma: a global perspective. **Arch Dermatol** 2001; 137:1493-6.

Griffin GK, Newton G, Tarrío ML, et al. IL-17 and TNF- $\alpha$  sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. **J Immunol** 2012; 188:6287-99.

Grotz TE, Glorioso JM, Pockaj BA, Harmsen WS, Jakub JW. Preservation of the deep muscular fascia and locoregional control in melanoma. **Surgery** 2013; 153:535-41.

Gruis NA, Sandkuijl LA, van der Velden PA, Bergman W, Frants RR. CDKN2 explains part of the clinical phenotype in Dutch familial atypical multiple-mole melanoma (FAMMM) syndrome families. **Melanoma Res** 1995; 5:169-77.

Grunhagen DJ, Brunstein F, Graveland WJ, van Geel AN, de Wilt JH, Eggermont AM. One hundred consecutive isolated limb perfusions With TNF- $\alpha$  and melphalan in melanoma patients with multiple. **Ann Surg** 2004; 240:939-48.

Gudbrandsdottir S, Hasselbach HC, Nielsen CH. Activated platelets enhance IL-10 secretion and reduce TNF- secretion by monocytes. **J Immunol** 2013; 191:4059-67.

Guglietta S, Chiavelli A, Zagato E, et al. Coagulation induced by C3aR-dependent NETosis drives protumorigenic neutrophils during small intestinal tumorigenesis. **Nat Commun** 2016; 7:11037.

Halama N, Zoernig I, Berthel A, et al. Tumoral immune cell exploitation in colorectal cancer metastases can be targeted effectively by anti-CCR5 therapy in cancer patients. **Cancer Cell** 2016; 29:587-601.

Harding SA, Din JN, Sarma J, Weatherall M, Fox KA, Newby DE. Flow cytometric analysis of circulating platelet-monocyte aggregates in whole blood: methodological considerations. **Thromb Haemost** 2007; 98:451-6.

Hawkes JE, Truong A, Meyer LJ. Genetic predisposition to melanoma. **Semin Oncol** 2016; 43:591-7.

Heaton KM, Sussman JJ, Gershenwald JE, et al. Surgical margins and prognostic factors in patients with thick (>4mm) primary melanoma. **Ann Surg Oncol** 1998; 5:322-8.

Hodis E, Watson IR, Kriukov GV, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. **Cell** 2012; 150:251-63.

Hunt R, Schaffer JV, Bolognia JL. Acquired melanocytic nevi. Literature review current through: Aug 2019. This topic last updated: Oct 09, 2018. Available from: <URL:https://bit.ly/2lXrPxr> [2019 jan 15]

[IARC] International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. **Global cancer observatory**. Available from: <URL:http://gco.iarc.fr> [2019 ago 12]

Jimbow K, Roth SI, Fitzpatrick TB, Szabo G. Mitotic activity in non-neoplastic melanocytes in vivo as determined by histochemical, autoradiographic and electron microscope studies. **J Cell Biol** 1975; 66:663-70.

Kanavy HE, Gerstenblith MR. Ultraviolet radiation and melanoma. **Semin Cutaneous Med Surg** 2011; 30:222-8.

Karakousis CP, Balch CM, Urist MM, Ross MM, Smith TJ, Bartolucci AA. Local recurrence in malignant melanoma: long-term results of the multiinstitutional randomized surgical trial. **Ann Surg Oncol** 1996; 3:446-52.

Khayat D, Rixe O, Martin G, et al. Surgical margins in cutaneous melanoma (2 cm versus 5 cm for lesions measuring less than 2.1-mm thick): long-term results of a large European multicentric phase III study. **Cancer** 2003; 97:1941-6.

Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. **Nat Rev Immunol** 2015; 2:73-86.

Kopp HG, Placke T, Salih HR. Platelet-derived transforming growth factor- $\beta$  down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. **Cancer Res** 2009; 69:7775-83.

Krüger-Krasagakes S, Krasagakis K, Garbe C, et al. Expression of interleukin 10 in human melanoma. **Br J Cancer** 1994; 70:1182-5.

Kretschmer L, Preusser KP. Standardized axillary lymphadenectomy improves local control but not survival in patients with palpable lymph node metastases of cutaneous malignant melanoma. **Langenbeck's Arch Surg** 2001; 386:418-25.

Kucera R, Tolpocan O, Treskova I, et al. Evaluation of IL-2, IL-6, IL-8 and IL-10 in malignant melanoma diagnostics. **Anticancer Res** 2015; 35:3537-42.

Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, et al. Combined vemirafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. **N Engl J Med** 2014; 371:1867-76.

Lasithiotakis KG, Leiter U, Gorkiewicz R, et al. The incidence and mortality of cutaneous melanoma in southern Germany. **Cancer** 2006; 107:1331-9.

Laübli H, Spanaus KS, Borsig L. Selectin-mediated activation of endothelial cells induces expression of CCL5 and promotes metastasis through recruitment of monocytes. **Blood** 2009; 114:4583-91.

Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. **Nat Rev Immunol** 2015; 12:731-44.

Leiter U, Stadler R, Mauch C, et al. Complete lymph node dissection versus no dissection in patients with sentinel lymph node biopsy positive melanoma (DeCOG-SLT): a multicentre, randomised, phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2016; 17:757-67.

Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, et al. Cutaneous melanoma: from pathogenesis to therapy (Review). **Int J Oncol** 2018; 52:1071-80.

Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. **J Immunol** 2014; 170:3369-76.

Linnskog R, Mohapatra P, Moradi F, Prasad CP, Andersson T. Demonstration of a WNT5A-IL-6 positive feedback loop in melanoma cells: Dual interference of this loop more effectively impairs melanoma cell invasion. **Oncotarget** 2016; 7:37790-802.

Luckheeram RV, Zhou R, Verna AD, Xia B. CD4<sup>+</sup> T cells: differentiation and functions. **Clin Dev Immunol** 2012; 2012:25135.

Luster AD. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med** 1998; 338:436-45.

Macey M, Azam U, McCarthy D, et al. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120 hematology system. **Clin Chem** 2002; 48:891-9.

Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Immunol Today** 1992; 13:265-70.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol** 2002; 23:549-55.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. **Nature** 2008; 54:436-44.

Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumor-associated macrophages as treatment targets in oncology. **Nat Rev Clin Oncol** 2017; 14:399-416.

Marsden JR, Newton-Bishop JA, Burrows L, et al. Revised U.K. guidelines for the management of cutaneous melanoma 2010. **Br J Dermatol** 2010; 163:238-56.

Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. **Science** 2002; 296:301-5.

McIntire RH, Morales PJ, Petroff MG, Colonna M, Hunt JS. Recombinant HLA-G5 and G6 drive U937 myelomonocytic cell production of TGF- $\beta$ 1. **J Leucoc Biol** 2004; 76:1220-8.

[MEDART] Medical Digital Medical Art. Available from:  
<URL:https://bit.ly/2kMIeEV> [2019 jan 12]

Mercer LK, Askling J, Raaschou P, et al. Risk of invasive melanoma in patients with rheumatoid arthritis treated with biologics: results from a collaborative project of 11 European biologic registers. **Ann Rheumatic Dis** 2017; 76:386-91.

Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. **Circulation** 2001; 104:1533-7.

Miles MV, Tang PH, Miles L, Steele PE, Moye MJ, Horn PS. Validation and application of an HPLC-EC method for analyses of coenzyme Q10 in blood platelets. **Biomed Chromatogr** 2008; 22:1403-8.

Miller AJ, Mihm MC. Melanoma - mechanisms of disease. **N Engl J Med** 2006; 355:845-53.

Mills KH. Regulatory T cells friend or foe in immunity to infection? **Nat Rev Immunol** 2004; 4:841-55.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2018 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018.

Mitteldorf C, Bertsch HP, Zapf A, Neumann C, Kretschmer L. Cutting a sentinel lymph node into slices is the optimal first step for examination of sentinel lymph nodes in melanoma patients. **Mod Pathol** 2009; 22:1622-7.

Mohos A, Sebestyén T, Liskay G, et al. A immune cell profile of sentinel lymph nodes in patients with malignant melanoma – FOXP3<sup>+</sup> cell density in cases with positive sentinel node status is associated with unfavorable clinical outcome. **J Translational Med** 2013; 11:43.

Moon H, Donahue LR, Choi E, et al. Melanocyte stem cell activation and translocation initiate cutaneous melanoma in response to UV exposure. **Cell Stem Cell** 2017; 21:665-78.

Moran AE, Kovacsovics-Bankowski M, Weinberg AD. The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 as targets for cancer immunotherapy. **Curr Opin Oncol** 2013; 25:230-7.

Mort RL, Jackson IJ, Patton EE. The melanocyte lineage in development and disease. **Development** 2015; 142:620-32.

Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, et al. Sentinel-node biopsy or observation in melanoma. **N Engl J Med** 2006; 355:1307-7.

Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, et al. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. **N Engl J Med** 2014; 370:599-609.

Mrowietz U, Schwenk U, Maune S, et al. The chemokine RANTES is secreted by human melanoma cells and is associated with enhanced tumor formation in nude mice. **Br J Cancer** 1999; 79:1025-31.

Mudun A, Murray DR, Herda SC, et al. Early stage melanoma: lymphoscintigraphy, reproducibility of sentinel node detection, and effectiveness of the intraoperative gamma probe. **Radiology** 1996; 199:171-5.

Nakatsumi H, Matsumoto M, Nakayama KI. Noncanonical pathway for regulation of CCL2 expression by an mTORC1-FOXK1 axis promotes recruitment of tumor-associated macrophages. **Cell Rep** 2017; 21:2471-86.

Nardone B, Orrell KA, Vakharia PP, West DP. Skin cancer associated with commonly prescribed drugs: tumor necrosis factor alpha inhibitors (TNF- $\alpha$ Is), angiotensin-receptor blockers (ARBs), phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE5Is) and statins - weighing the evidence. **Expert Opin Drug Saf** 2018; 17:139-47.

Negin B, Panka D, Wang W, et al. Effect of melanoma on immune function in the regional lymph node basin. **Clin Cancer Res** 2008; 14:654-9.

Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptative immunity; the role of interleukin-10. **Front Immunol** 2013; 4:129.

Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. **Cancer Res** 1999; 59:1295-300.

Nooijen PT, Westphal JR, Eggermont AM, et al. Endothelial P-selectin expression is reduced in advanced primary melanoma and melanoma metastasis. **Am J Pathol** 1998; 152:679-82.

Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. **Immunity** 2014; 41:49-61.

Pagès F, Berger A, Camus M, et al. Effector memory t cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. **N Engl J Med** 2005; 353:2654-666.

Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. **Blood** 2005; 105:178-85.

Pampena R, Kyrgidis A, Lallas A, Moscarella E, Argenziano G, Longo C. A meta-analysis of nevus-associated melanoma: prevalence and practical implications. **J Am Acad Dermatol** 2017; 77:938-45.

Pennello G, Devesa S, Gail M. Association of surface ultraviolet B radiation levels with melanoma and nonmelanoma skin cancer in United States blacks. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2000; 9:291-7.

Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. **Toxicologic Pathol** 2012; 40:186-204.

Picardo M, Slominski AT. Melanin pigmentation and melanoma. **Exp Dermatol** 2017; 26:555-6.

Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. **Nat Genet** 2003; 33:19-20.

Qi CL, Wei B, Ye J, et al. P-selectin-mediated platelet adhesion promotes the metastasis of murine melanoma cells. **PLoS One** 2014; 9:e91320.

Qi C, Wei B, Zhou W, et al. P-selectin-mediated platelet adhesion promotes tumor growth. **Oncotarget** 2015; 6:6584-96.

Qian BZ, Zhang H, Li J, et al. FLT1 signaling in metastasis-associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis. **J Exp Med** 2015; 212:1433-48.

Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In Vivo** 2014; 28:1005-11.

Reidl J, Pabinger I, Ay C. Platelets in cancer and thrombosis. **Hamostaseologie** 2014; 34:54-62.

Rhee JS, Black M, Schubert U, et al. The functional role of blood platelet components in angiogenesis. **Thromb Haemost** 2004; 92:394-402.

Robert C, Karaszwska B, Schachter J, et al. Improved overall survival in melanoma with combined Dabrafenib and Trametinib. **N Engl J Med** 2015a; 372:30-9.

Robert C, Schachter J, Long GV, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. **N Engl J Med** 2015b; 372:2521-32.

Rondina MT, Carlisle M, Fraughton T, et al. Platelet-monocyte aggregate formation and mortality risk in older patients with severe sepsis and septic shock. **J Gerontol** 2015; 70:225-31.

Russo AE, Torrisi E, Bevelacqua Y, et al. Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (review). **Int J Oncol** 2009; 34:1481-9.

Sahu RP, Turner MJ, DaSilva SC, et al. The environmental stressor ultraviolet B radiation inhibits murine antitumor immunity through its ability to generate platelet-activating factors agonists. **Carcinogenesis** 2012; 2012:925135.

Santoni M, Bracarda S, Nabissi M, et al. CXC and CC chemokines as angiogenic modulators in nonhaematological tumors. **Biomed Res Int** 2014; 2014:768758.

Schlesinger M. Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. **J Hematol Oncol** 2018; 11:1-15.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science** 2011; 331:1565-70.

Scope A, Dusza SW, Halpern AC, et al. The "ugly duckling" sign: agreement between observers. **Arch Dermatol** 2008; 144:58-64.

Setianto BY, Hartopo AB, Gharini PRP, Anggrahini DW, Irawan B. Circulating soluble CD40 ligand mediates the interaction between neutrophils and platelets in acute coronary syndrome. **Heart Vessels** 2010; 25:282-7.

Seykora J, Elder D. Dysplastic nevi and other risk markers for melanoma. **Semin Oncol** 1996; 23:682-7.

Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanoma. **Nat Rev Cancer** 2016; 16:345-58.

Shaw JHF, Rumball EM. Complications and local recurrence following lymphadenectomy. **Br J Surg** 1990; 77:760-4.

Skin Cancer Foundation. Melanoma warning signs. Available from: <URL:<https://bit.ly/2kMyhqU>> [2019 jan 15]

Smyth MJ, Teng MWL, Swann J, Kyparissoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. **J Immunol** 2006; 176:1582-7.

Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. **N Engl J Med** 2012; 366:707-14.

Soubrane C, Rixe O, Méric JB, Khayat D, Mouawad R. Pretreatment serum interleukin-6 concentration as a prognostic factor of overall survival in metastatic malignant melanoma patients treated with biochemotherapy: a retrospective study. **Melanoma Res** 2005; 15:199-204.

Soura E, Eliades P, Shannon K, Stratigos AJ, Tsao H. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management-emerging melanoma cancer complexes and genetic counseling. **J Am Acad Dermatol** 2016; 74:411-20.

Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. **J Mol Med** 2011; 89:109-21.

Swetter SM, Boldrick JC, Jung SY, Egbert BM, Harvell JD. Increasing Incidence of Lentigo Maligna Melanoma Subtypes: Northern California and National Trends 1990–2000. **J Invest Dermatol** 2005; 125:685-91.

Teng MW, Galon J, Fridman WH, Smyth MJ. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. **J Clin Invest** 2015; 125:3338-46.

Thomas MR, Storey RF. The role of platelets in inflammation. **Thromb Haemost** 2015; 114:449-58.

Toriso-Itakura H, Lee JH, Huynh Y, Ye X, Essner R, Morton DL. Monocyte-derived IL-10 expression predicts prognosis of stage IV melanoma patients. **J Immunother** 2007; 30:831-8.

Tsao H, Chin L, Garraway L, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. **Genes Dev** 2012; 26:1131-55.

Ullrich HE, Byrne SN. The immunologic revolution: photoimmunology. **J Invest Dermatol** 2012; 132:896-905.

Urist MM, Balch CM, Soong SJ, et al. Head and neck melanoma in 534 clinical stage I patients: a prognostic factors analysis and results of surgical treatment. **Ann Surg** 1984; 200:769-75.

van Es M, Sturk A, Middeldorp S, Nieuwland R. Effects of cancer on platelets. **Semin Oncol** 2014; 3:311-8.

Veronesi U, Cascinelli N, Adamus J, et al. Thin stage I primary cutaneous malignant melanoma. comparison of excision with margins of 1 or 3 cm. **N Engl J Med** 1988; 318:1159-61.

Veronesi U, Cascinelli N. Narrow excision (1-cmMargin): a safe procedure for thin cutaneous melanoma. **Arch Surg** 1991; 126:438-41.

Vestergaard ME, Macaskill P, Holt PE, Menzies SW. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. **Br J Dermatol** 2008; 159:669-76.

Watt AJ, Kotsis SV, Chung KC. Risk of melanoma arising in large congenital melanocytic nevi: a systematic review. **Plast Reconstr Surg** 2004; 113:1968-74.

Weinberg AD, Rivera MM, Prell R, et al. Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. **J Immunol** 2000; 164:2160-9.

Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Rutkowski P, et al. Overall survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. **N Engl J Med** 2017; 377:1345-56.

Wolf MJ, Hoos A, Bauer J, et al. Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. **Cancer Cell** 2012; 22:91-105.

Wolff K, Johnson RC, Saavedra A, Ellen KR. **Fitzpatrick's color atlas and synopsis clinical dermatology**. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: McGraw-Hill Education; 2017. Melanoma precursors and primary cutaneous melanoma; p.248-79.

Wong SL, Faries MB, Kennedy EB, et al. Sentinel lymph node biopsy and management of regional lymph node in melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology clinical practice guideline update. **J Clin Oncol** 2017; 36:399-413.

Wrightson WR, Wond SL, Edwards MJ, et al. Complications associated with sentinel lymph node biopsy for melanoma. **Ann Surg Oncol** 2003; 10:676-80.

Wu XC, Eide MJ, King J, et al. Racial and ethnic variations in incidence and survival of cutaneous melanoma in United States, 1999-2006. **J Am Acad Dermatol** 2011; 65:s26e1-s26e13.

Yeung J, Li W, Holinstat M. Platelet signaling and disease: targeted therapy for thrombosis and other related diseases. **Pharmacol Rev** 2018; 70:526-48.

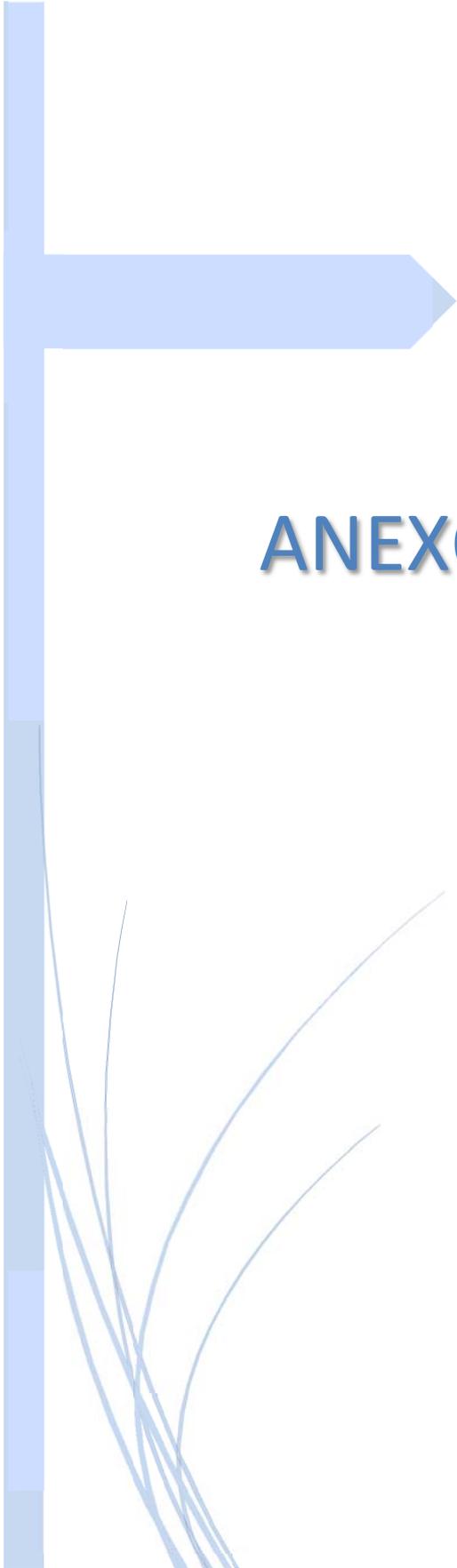
Yip C, Ignjatovic V, Attard C, Monagle P, Linden MD. First report of elevated monocyte-platelet aggregates in health children. **Plos One** 2013; 8:1-5.

Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. **N Engl J Med** 2003; 348:203-13.

Zhang QW, Liu L, Gong CY, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. **Plos One** 2012; 7:e50946.

Zlotnic A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity** 2000; 12:121-7.

Zuo L, Weger J, Yang Q, et al. Germline mutations in the p16<sup>ink4a</sup> in familial melanoma. **Nat Genet** 1996; 12:97-9.



# ANEXOS

## Anexo 1 - Comprovante de Aprovação pelo CEP do HCP

SOCIEDADE PERNAMBUCANA  
DE COMBATE AO CÂNCER-  
SPCC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DE METÁSTASE DE LINFONODOS REGIONAIS, DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E QUIMIOTÁTICOS EM PACIENTES COM MELANOMA CUTÂNEO

**Pesquisador:** LEURIDAN CAVALCANTE TORRES

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 40008514.0.0000.5205

**Instituição Proponente:** SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 972.087

**Data da Relatoria:** 10/03/2015

#### Apresentação do Projeto:

O projeto em questão será um estudo coorte prospectivo, exploratório e translacional

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será associar também o estudo de marcadores de superfície de membrana das plaquetas e de quimiocinas sintetizadas por diferentes populações celulares do sistema imune nos pacientes com melanoma, buscando descobrir novas abordagens para diagnóstico e prognóstico que possam ajudar no estadiamento, na tomada de decisões clínicas e eventualmente novos alvos terapêuticos.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Para os sujeitos da pesquisa: A coleta de sangue pode causar desconforto e há risco de pequenossangramentos. Entretanto, o desconforto é minimizado por uso de pomada anestésica. A venopunção é realizada de forma asséptica, por pessoal treinado. Sempre que possível, a coleta coincidirá com a coleta de material (sangue) para exames solicitados pela equipe médica. O tratamento cirúrgico é o tratamento

padrão, sendo seu risco inerente ao tratamento da patologia sem riscos adicionais.

Benefícios:

**Endereço:** Av. Cruz Cabugá, 1597

**Bairro:** Santo Amaro

**CEP:** 50.040-000

**UF:** PE **Município:** RECIFE

**Telefone:** (813)217--8197

**Fax:** (813)217--8197

**E-mail:** cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA  
DE COMBATE AO CÂNCER-  
SPCC



Continuação do Parecer: 972.087

O grupo 3 (linfonodos clinicamente tumorais) podem, pelo método do estudo, serem diagnosticados com doença micrometastática em linfonodos não estudados na conduta padrão, com possibilidade de benefício real para este subgrupo. O potencial benefício advindo das informações geradas pela pesquisa pode contribuir para o manejo de casos semelhantes no futuro

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A estatística descritiva será representada por tabelas de distribuição de frequência com medidas de tendência central e de dispersão (mediana e intervalo interquartil). As comparações estatísticas entre os grupos (tumor primário e metastático) serão realizadas pelo teste T não paramétrico (Mann-Whitney e Kruskalls-Wallis). O teste chi-square será utilizado para comparar a probabilidade de envolvimento metastático entre os linfonodos

radioativos e não radioativos. Para análise de sobrevida e recidiva será utilizado estimativa de Kaplan-Meier. Serão considerados significativos valores de P 0,05.

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

todos os termos foram apresentados

**Recomendações:**

nenhuma

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

aprovado

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 04 de Março de 2015

---

**Assinado por:**  
**ISABEL CRISTINA LEAL**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. Cruz Cabugá, 1597  
**Bairro:** Santo Amaro **CEP:** 50.040-000  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (813)217-8197 **Fax:** (813)217-8197 **E-mail:** cep@hcp.org.br

Página 02 de 02

## Anexo 2 - TNM pela AJCC Cancer Staging Manual (American Joint Committee on Cancer)

### AJCC 8th edition melanoma TNM definitions

Primary tumor (T)		
T category	Thickness	Ulceration status
TX: Primary tumor thickness cannot be assessed (eg, diagnosis by curettage)	Not applicable	Not applicable
T0: No evidence of primary tumor (eg, unknown primary or completely regressed melanoma)	Not applicable	Not applicable
Tis (melanoma in situ)	Not applicable	Not applicable
T1	≤1.0 mm	Unknown or unspecified
T1a	<0.8 mm	Without ulceration
T1b	<0.8 mm	With ulceration
T1c	0.8 to 1 mm	With or without ulceration
T2	>1 to 2 mm	Unknown or unspecified
T2a	>1 to 2 mm	Without ulceration
T2b	>1 to 2 mm	With ulceration
T3	>2 to 4 mm	Unknown or unspecified
T3a	>2 to 4 mm	Without ulceration
T3b	>2 to 4 mm	With ulceration
T4	>4 mm	Unknown or unspecified
T4a	>4 mm	Without ulceration
T4b	>4 mm	With ulceration
Regional lymph nodes (N)		
N category	Extent of regional lymph node and/or lymphatic metastasis	
	Number of tumor-involved regional lymph node	Presence of in-transit, satellite, and/or microsatellite metastases
NX	Regional nodes not assessed (eg, SLN biopsy not performed, regional nodes previously removed for another reason). <b>Exception:</b> Pathological N category is not required for T1 melanomas, use cN.	No
N0	No regional metastases detected	No
N1	One tumor-involved node or in-transit, satellite, and/or microsatellite metastases with no tumor-involved nodes	
N1a	One clinically occult (ie, detected by SLN biopsy)	No
N1b	One clinically detected	No
N1c	No regional lymph node disease	Yes
N2	Two or three tumor-involved nodes or in-transit, satellite, and/or microsatellite metastases with one tumor-involved node	
N2a	Two or three clinically occult (ie, detected by SLN biopsy)	No
N2b	Two or three, at least one of which was clinically detected	No
N2c	One clinically occult or clinically detected	Yes
N3	Four or more tumor-involved nodes or in-transit, satellite, and/or microsatellite metastases with two or more tumor-involved nodes, or any number of matted nodes without or with in-transit, satellite, and/or microsatellite metastases	
N3a	Four or more clinically occult (ie, detected by SLN biopsy)	No
N3b	Four or more, at least one of which was clinically detected, or presence of any number of matted nodes	No
N3c	Two or more clinically occult or clinically detected and/or presence of any number of matted nodes	Yes
Distant metastasis (M)		
M category	M criteria	
	Anatomic site	LDH level
M0	No evidence of distant metastasis	Not applicable
M1	Evidence of distant metastasis	See below
M1a	Distant metastasis to skin, soft tissue including muscle, and/or nonregional lymph node	Not recorded or unspecified
M1a(0)		Not elevated
M1a(1)		Elevated
M1b	Distant metastasis to lung with or without M1a sites of disease	Not recorded or unspecified
M1b(0)		Not elevated
M1b(1)		Elevated
M1c	Distant metastasis to non-CNS visceral sites with or without M1a or M1b sites of disease	Not recorded or unspecified
M1c(0)		Not elevated
M1c(1)		Elevated
M1d	Distant metastasis to CNS with or without M1a, M1b, or M1c sites of disease	Not recorded or unspecified
M1d(0)		Normal
M1d(1)		Elevated

AJCC – American Joint Committee on Cancer; SLN – Linfonodo sentinela; TNM – Tumor, linfonodos, metastases.

### AJCC 8th edition melanoma TNM prognostic stage groups

<b>Clinical (cTNM)</b>			
Clinical staging includes microstaging of the primary melanoma and clinical/radiologic/biopsy evaluation for metastases. By convention, clinical staging should be used after biopsy of the primary melanoma, with clinical assessment for regional and distant metastases. Note that pathological assessment of the primary melanoma is used for both clinical and pathological classification. Diagnostic biopsies to evaluate possible regional and/or distant metastasis also are included. Note there is only one stage group for clinical Stage III melanoma.			
When T is...	And N is...	And M is...	Then the clinical stage group is...
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IB
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
Any T, Tis	≥N1	M0	III
Any T	Any N	M1	IV
<b>Pathological (pTNM)</b>			
Pathological staging includes microstaging of the primary melanoma, including any additional staging information from the wide-excision (surgical) specimen that constitutes primary tumor surgical treatment and pathological information about the regional lymph nodes after SLN biopsy or therapeutic lymph node dissection for clinically evident regional lymph node disease.			
When T is...	And N is...	And M is...	Then the pathological stage group is...
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IA
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
T0	N1b, N1c	M0	IIIB
T0	N2b, N2c, N3b, or N3c	M0	IIIC
T1a/b-T2a	N1a or N2a	M0	IIIA
T1a/b-T2a	N1b/c or N2b	M0	IIIB
T2b/T3a	N1a-N2b	M0	IIIB
T1a-T3a	N2c or N3a/b/c	M0	IIIC
T3b/T4a	Any N ≥N1	M0	IIIC
T4b	N1a-N2c	M0	IIIC
T4b	N3a/b/c	M0	IIID
Any T, Tis	Any N	M1	IV

AJCC – American Joint Committee on Cancer; LDH – Desidrogenase láctica; SLN – Linfonodo sentinela; CNS – Sistema nervoso central; TNM – Tumor, linfonodos, metastases.

Received: 29 November 2017 | Accepted: 4 January 2018  
DOI: 10.1002/jso.25001

RESEARCH ARTICLE

WILEY 

## Could OX40 agonist antibody promote activation of the anti-tumor immune response in gastric cancer?

Mário R. Martins MD<sup>1</sup>  | Rogério L. d. Santos MD<sup>1</sup> | Kleber d. N. Jatahy<sup>2</sup> |  
Marina C. d. Matta<sup>2</sup> | Thales P. Batista MD, Msc<sup>4</sup> | José Iran C. Júnior MD<sup>1,2</sup> |  
Maria D. F. S. Begnami MD, PhD<sup>3</sup> | Leuridan C. Torres PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Oncology Surgical Department, Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer—Hospital do Câncer de Pernambuco (SPCC—HCP), Recife, Brazil

<sup>2</sup>Translational Research Laboratory Prof. C. A. Hart, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brazil

<sup>3</sup>Anatomic Pathology Department, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup>Surgical Department, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brazil

### Correspondence

Mário R. Martins, MD, MSc, Oncology Surgical Department, Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer—Hospital do Câncer de Pernambuco (SPCC—HCP), Av. Cruz Cabugá, 1597, Recife, PE 50040-000, Brazil.  
Email: mario\_rino@hotmail.com

### Funding information

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco APQ (FACEPE).  
Grant number: 0688-4.01/15

**Background and Objectives:** OX40, a membrane-bound molecule of the tumor-necrosis-factor-receptor superfamily, is a critical costimulatory receptor during the immune response, especially to T cells, but studies described their presence of OX-40 on neutrophils and monocytes, suggesting a potential role in the activation of immune response. Our aim was to characterize costimulatory receptors OX40 expression on circulating leukocytes in gastric cancer to identify novel targets for immunotherapy.

**Methods:** Peripheral blood mononuclear cells were isolated from 24 gastric cancer patients and 34 healthy controls and the expression of costimulatory (OX40) receptors were analyzed on T cells, neutrophil and monocyte using monoclonal antibodies by flow cytometry.

**Results:** We found that the higher levels of OX40 + T cells, monocytes/OX40+ and neutrophils/OX40+ from gastric cancer patients when compared to controls ( $P < 0.0001$ ), and also higher levels of OX40+ T cells when compared to stages III and IV ( $P = 0.02$ ). Percentage levels of total T cells were similar between patients and controls.

**Conclusions:** OX40 as a therapeutic agent has been investigated in many preclinical tumor models. Our findings suggest that of levels of costimulatory in T cells in GC will direct future studies on the role that costimulatory receptors play in the failure of T cell-mediated immunity.

### KEYWORDS

immunotherapy, neoplasm, receptor OX40 (CD134), stomach

## 1 | INTRODUCTION

The incidence of gastric cancer (GC) has decreased over the past three decades, although it was still the third leading cancer-related cause of death worldwide in 2012.<sup>1</sup> Nowadays, surgical resection is considered the best procedure in the treatment of GC patients with early-stage disease. However, the control of GC at advanced-stage disease remains difficult.<sup>2</sup> Many studies focusing on the role of host immune

response, especially T lymphocytes, play an important role in controlling the development of tumors.<sup>3</sup>

Neoplasm may elicit antitumor immune responses because of tumor specific antigens, which interact with the immune system of the patient. Indeed, tumor antigen specific T cells are frequently identified in patients with cancer, however, they often fail to control tumor progression.<sup>4</sup> Understanding the reasons underlying this failure can open new possibilities of T cell immunotherapy in gastric cancer.



## MicroRNA expression profiling provides novel insights into immune-related pathways involved in gastric cancer

Mário Rino Martins<sup>1</sup> · Renata Santos Almeida<sup>2</sup> · Norma Lucena-Silva<sup>2</sup> · Cláudia Malheiros Coutinho-Camilo<sup>3</sup> · Israel Torjal<sup>3</sup> · Rogério Luiz dos Santos<sup>1</sup> · Cristiana Libardi Miranda-Furtado<sup>4</sup> · Álvaro Fabrício Lopes Rios<sup>5</sup> · Leuridan Cavalcante Torres<sup>6</sup> · Maria Dirlei F. S. Begnami<sup>7</sup>

Received: 22 May 2019 / Accepted: 5 August 2019  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

### Abstract

Gastric cancer is one of the most common cancers, and an increasing number of studies have found that microRNAs (miRNAs) play essential roles in gastric cancer progression; however, the roles of specific miRNAs involved in the immune response to this disease remain unclear. We compared the miRNA expression in tissues from primary gastric cancer patients and healthy controls to find miRNAs dysregulated in gastric cancer and used bioinformatics tools to determine potential roles of these miRNAs in the immune system. We evaluated 25 primary gastric cancer tissues and five healthy gastric tissues. Quantitative real-time polymerase chain reaction was performed for a set of miRNAs, followed by the prediction of their target genes and functional enrichment analysis of these targets. Analysis of a microarray dataset showed that the miRNA miR-196a-5p was significantly upregulated, while miR-374a-5p and miR-375 were downregulated in gastric cancer patients. In addition, miR-374-5p was significantly downregulated in patients with metastasis compared with its expression levels in non-metastatic patients ( $p=0.03$ ). Bioinformatics analysis suggested that the pathways regulated by these differentially expressed miRNAs were related to the immune response, cell adhesion, and cell migration. Most importantly, this study provides a new insight into the potential use of multiple miRNAs to find distinct pathways of immune regulation in gastric cancer.

**Keywords** Gastric cancer · MicroRNA · Microarray analysis · Immune system · Bioinformatics

### Introduction

Stomach cancer is a public health problem worldwide, with an estimated 1,000,000 new cases and 783,000 deaths per year, thus accounting for 8.8% of the cancer deaths globally, with 70% of the new cases and deaths occurring in developing countries [1]. Brazil and, specifically, its Northeast region are high-incidence areas for this disease [1]. Thus, it is important to better understand the mechanism of gastric cancer (GC) progression, including proliferation, growth, migration, invasion, and apoptosis [2]. Numerous studies have demonstrated that non-coding RNAs play essential roles in GC initiation and progression [3, 4].

MicroRNAs (miRNAs, miRs) are small non-coding RNAs of 20–22 nucleotides in length, which are involved in crucial biological processes [5]. miRNAs regulate gene expression through binding to the 3' untranslated region (UTR) of target mRNAs, thus leading to mRNA cleavage or suppression of its translation [6]. Abnormal expression levels of miRNAs are a well-known and vital

✉ Mário Rino Martins  
mario\_rino@hotmail.com

<sup>1</sup> Oncology Surgical Department, Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer - Hospital do Câncer de Pernambuco, Recife, Brazil

<sup>2</sup> Aggeu Magalhães Institute/Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil

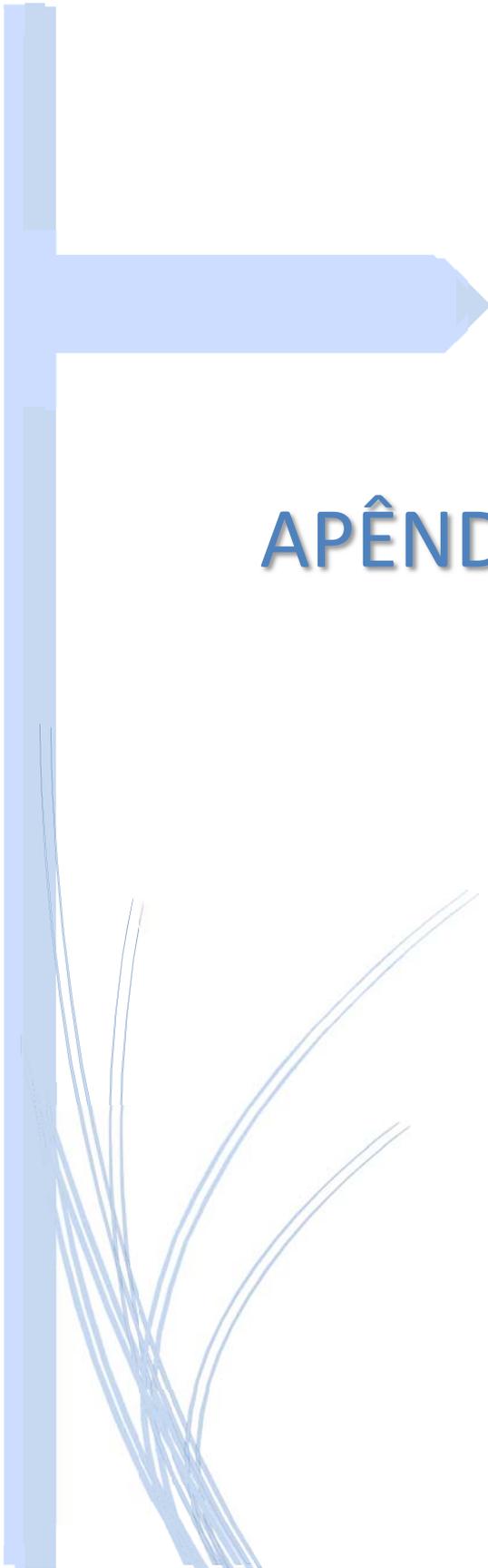
<sup>3</sup> International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup> Drug Research and Development Center, Postgraduate Program in Medical and Surgical Science, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

<sup>5</sup> Center of Bioscience and Biotechnology, State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>6</sup> Translational Research Laboratory Prof. C.A. Hart, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brazil

<sup>7</sup> Anatomic Pathology Department, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil



# APÊNDICES

## Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONVIDO O SENHOR (A) PARA PARTICIPAR DESTA PESQUISA:

1. NOME DO PACIENTE.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO:.....CIDADE.....

CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **AVALIAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS, QUIMIOTÁTICOS E AGREGADOS PLAQUETÁRIOS EM PACIENTES COM MELANOMA CUTÂNEO.**

2. PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: CARGO/FUNÇÃO:

- Rogério Santos – Cirurgião Oncológico – Departamento de Cirurgia Oncológica do Hospital do Câncer de Pernambuco
- Prof. Dr. João Pedreira Duprat Neto – Cirurgião Oncológico – Chefe do Departamento de Tumores Cutâneos do AC Camargo Cancer Center
- Prof. Dra. Leuridan Cavalcante Torres – Coordenadora do Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto Materno Infantil de Pernambuco – IMIP

3. UNIDADE: Hospital do Câncer de Pernambuco, Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

4. PESQUISADORES COLABORADORES:

5. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO                      RISCO MÍNIMO                      X                      RISCO MÉDIO  
RISCO BAIXO                      RISCO MAIOR

6. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

7. Gostáramos de convidá-Lo (a) a participar de nossa pesquisa.

8. Justificativa: Pacientes com melanoma cutâneo tem um alto risco de desenvolver metástases em linfonodos satélites de drenagem. Esses pacientes, mesmo tratados, apresentam um risco aumentado de ter a doença novamente (local ou à distância). Por isso, será importante esta

pesquisa para descobrir a causa de o paciente desenvolver novamente a doença local ou ter a doença em outros lugares além da pele.

9. O objetivo deste estudo é entender melhor o processo metastático do melanoma cutâneo, estudando os linfonodos acometidos pelo tumor, assim como, fatores sanguíneos e plaquetários que possam estar envolvidos no processo.

10. Os testes laboratoriais serão realizados no sangue dos pacientes. A coleta será feita durante os exames pré-operatórios ou, se possível, durante o procedimento cirúrgico para minimizar as punções venosas que os pacientes possam necessitar.

11. Com relação ao material de biópsia, este será obtido durante os procedimentos cirúrgicos considerados padrão para o tratamento do melanoma cutâneo, sendo que todo material será processado para exame histopatológico de rotina e imunohistoquímico se necessário, conforme tratamento padrão. Nos pacientes com metástase linfonodal que forem submetidos à biópsia do linfonodo sentinela, este procedimento será realizado durante cirurgia padronizada e o material estudado conforme o padrão para estes casos.

12. Existe um risco mínimo para o participante de pesquisa. A coleta poderá provocar uma mancha vermelha ou roxa no local da picada da agulha. Os pais dos pacientes serão orientados de como tratar, caso ocorra mancha vermelha ou roxa no local. Nos pacientes submetidos à tratamento cirúrgico o risco existente é o do tratamento cirúrgico padrão para o melanoma cutâneo. Nos pacientes com metástase linfonodal que forem submetidos à biópsia do linfonodo sentinela, existe o risco adicional mínimo de uma pequena incisão para a retirada do linfonodo, porém, isto possibilitará o diagnóstico de doença micrometastática em linfonodos não estudados na conduta padrão, com possibilidade de benefício real para estes pacientes.

13. O sangue colhido será usado para os exames laboratoriais e o material de biópsia será guardado no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de Pernambuco.

14. Não existe benefício direto para o participante da pesquisa. No final do estudo, teremos um melhor conhecimento do processo metastático do melanoma cutâneo e possíveis fatores diagnósticos e prognósticos.

**15. Os pesquisadores envolvidos com este projeto estarão disponíveis para esclarecer as dúvidas que surgirão durante o desenvolvimento do estudo. Os principais investigadores são Dra. Leuridan Cavalcante Torres e Dr. Rogério Santos que é encontrada no Departamento de Cirurgia Oncológica do Hospital do Câncer de Pernambuco na Avenida Cruz Cabugá 1597, Santo Amaro, Recife – PE (Telefone: 81 3217 8000); Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de Ética em Pesquisado HCP na Avenida Cruz**

**Cabugá 1597, Santo Amaro, Recife – PE (Telefone: 81 32178000). Horário: segunda a sexta, das 8h as 12h e das 14h as 16h.**13. Os convidados poderão desistir de fazer parte da pesquisa.

16. Não serão divulgados os nomes dos pacientes da pesquisa.

17. Os pacientes poderão ser informados dos resultados obtidos nos testes laboratoriais e dos exames de biópsia realizados.

18. Os pacientes não terão nenhum custo pessoal durante a realização do trabalho, incluindo exames e consultas. Não haverá compensação financeira para os pacientes.

19. Em caso de dano físico, diretamente causado pela coleta de sangue e/ou tecido, o participante tem direito a tratamento médico no Hospital do Câncer de Pernambuco.

20. Os pesquisadores deste trabalho poderão utilizar os dados e o material coletado para a realização desta pesquisa, assim como utilizar os dados para pesquisas futuras, não havendo necessidade de informar os pacientes, à não ser que os mesmos desejem ser informados futuramente.

#### CONSENTIMENTO

**Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o objetivo e os testes laboratoriais que serão realizados neste trabalho.**

**Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os testes laboratoriais que serão realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também estou isenta de despesas e que terei a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no meu atendimento neste serviço.**

**Declaro estarem claros para mim quais são os objetivos desta atividade, como participarei, que terei garantia de confidencialidade e a certeza de que obterei esclarecimentos a qualquer momento, bem como retirada deste consentimento a qualquer momento. Estou ciente que minha participação é isenta de despesas ou ganhos financeiros e que isto não irá interferir no meu tratamento.**

Se os meus materiais biológicos guardados no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de Pernambuco forem utilizados em pesquisas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa, escolho livremente a opção abaixo assinalada:

Autorizo a utilização dos meus materiais biológicos sem necessidade de novo consentimento a cada pesquisa.

Desejo ser contactada para autorizar o uso dos meus materiais biológicos a cada pesquisa e em caso de impossibilidade de contato comigo, indico que a nova autorização seja fornecida pelo senhor \_\_\_\_\_

(nome e contato do familiar ou representante legal)

Nome e assinatura do paciente.....

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura do Responsável Legal/Testemunha Imparcial.....

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Dr. Rogerio Santos

Profa. Dra Leuridan Torres

(Pesquisadores Responsáveis)

## Apêndice 2 – Questionário padrão – ficha clínica

### APÊNDICE 2 – Questionário padrão – Ficha Clínica

Nome \_\_\_\_\_

Nascimento \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_ Anos completos \_\_\_\_ Naturalidade \_\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_ Comp \_\_\_\_\_

CEP \_\_\_\_\_/\_\_\_\_ Bairro \_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_

Pai \_\_\_\_\_

Mãe \_\_\_\_\_

Sexo \_\_\_\_ Cor \_\_\_\_\_

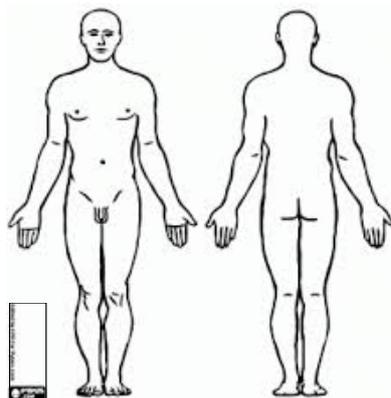
Uso de medicação \_\_\_\_\_

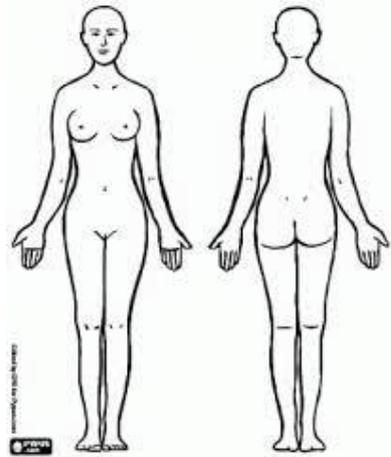
Alergias \_\_\_\_\_

Antecedentes pessoais \_\_\_\_\_

Antecedentes familiares \_\_\_\_\_

Data do diagnóstico do Melanoma \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_ (1ª biópsia)





Histopatológico:

Tipo - \_\_\_\_\_

Fase de crescimento - \_\_\_\_\_

Clark - \_\_\_\_\_ Breslow - \_\_\_\_\_ Ulceração - \_\_\_\_\_

Índice Mitótico - \_\_\_\_\_ mm<sup>2</sup> Regressão - \_\_\_\_\_

Infiltrado Linfocitário - \_\_\_\_\_

Invasão Vascular ou Peri-neural - \_\_\_\_\_

Satelitose - \_\_\_\_\_

Margens cirúrgicas - \_\_\_\_\_

Tratamento Cirúrgico: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Complicações pós-operatórias - \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Biópsia do Linfonodo Sentinela - \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ Data - \_\_/\_\_/\_\_

Histopatológico da linfadenectomia - \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Evolução :