

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE –
UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Fernando De Marco dos Santos

**RELAÇÃO DO INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL COM A POSITIVIDADE
DO LINFONODO SENTINELA NO MELANOMA CUTÂNEO FINO**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2016

Fernando De Marco dos Santos

**RELAÇÃO DO INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL COM A POSITIVIDADE
DO LINFONODO SENTINELA NO MELANOMA CUTÂNEO FINO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA, como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Renan Rangel Bonamigo

Co-orientador: Prof. Dr. Roque Furian

Porto Alegre

2016

AGRADECIMENTOS

Devido ao apoio permanente e incondicional, manifesto o mais profundo agradecimento à Lisiane Braido, minha esposa. Também aos meus filhos, Eduarda e José, por serem fonte de inspiração e motivação, ainda mais quando os objetivos parecem inatingíveis.

Ao Dr. Renan Rangel Bonamigo, pela paciência com este cirurgião e insistência em me resgatar da rotina mecanicista e elevar, dentro das minhas limitações, meus conceitos acadêmicos e oncológicos a fim de alcançar a excelência na decisão assistencialista.

Ao Dr. Roque Domingos Furian, pelos conselhos e aprofundamento (literalmente microscópico) da visão sobre a Patologia.

À UFCSPA (professores e funcionários) e ao Laboratório de Patologia da Santa Casa, por me receberem, mais uma vez, de portas abertas e gerarem as condições necessárias para a viabilidade desta pesquisa.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 História do melanoma	1
1.2 Melanoma cutâneo primário: conceituação e epidemiologia	2
1.3 Fatores de risco.....	5
1.4 Estadiamento do melanoma.....	6
1.5 Prognóstico	8
1.6 Seguimento dos pacientes com melanoma.....	9
1.7 Linfonodo sentinela	9
1.7.1 História e evolução do linfonodo sentinela	9
1.7.2 Indicações de realização do linfonodo sentinela no MCP fino.....	13
1.7.3 Linfadenectomia após LS positivo no MCP fino	13
1.7.4 Sistemática da pesquisa do linfonodo sentinela.....	14
1.8 Infiltrado linfocitário tumoral.....	18
1.9 Referências	22
2 OBJETIVOS	29
2.1 objetivo primário	29
2.2 Objetivos secundários	29
3 ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO.....	30
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
5 ANEXOS	53
5.1 Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA.....	53
5.2 Normas da revista	57

LISTA DE ABREVIATURAS

CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
DS	Disseminativo Superficial
HE	Hematoxilina-eosina
IC	Intervalo de Confiança
IHQ	Imuno-histoquímica
ILT	Infiltrado Linfocitário Tumoral
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LS	Linfonodo Sentinela
MCP	Melanoma Cutâneo Primário
RR	Risco Relativo
UFCSPA	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação das incidências de melanoma no mundo com as estimativas de incidências de melanoma para o Brasil e para o Rio Grande do Sul em 2016	5
Figura 2 - Linfografia para determinar o linfonodo sentinela	10
Figura 3 - Linfocintilografia de membros com drenagem linfática padrão	12
Figura 4 - Linfocintilografia de tronco com padrão errático de drenagem	12
Figura 5 - Azul patente que será infiltrado na derme pericicatricial	15
Figura 6 – Preparo pré-operatório e local da captação do LS	15
Figura 7 - Marcação dos limites da ampliação e local da incisão para a ressecção do LS	16
Figura 8 - Resultado pós-infiltração de azul patente e delimitação da ampliação de margens	16
Figura 9 - Resultado após ampliação de margens e dissecação do LS	17
Figura 10 – Captação do gama probe sobre o LS ressecado	17
Figura 11 - Resultado final do pós-operatório imediato	18
Figura 12 - Infiltrado linfocitário tumoral acentuado	20
Figura 13 - Infiltrado linfocitário tumoral moderado	20
Figura 14 - Infiltrado linfocitário tumoral leve	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa de incidências de neoplasias malignas para o Brasil em 2016	3
Tabela 2 - Estimativa de incidências de neoplasias malignas para o Estado do Rio Grande do Sul em 2016	4
Tabela 3 - Classificação do Melanoma TNM.....	7
Tabela 4 - Estadiamento clínico	8
Tabela 5 - Sobrevida conforme estágio clínico do melanoma	8

RESUMO

Introdução: a indicação de pesquisar o linfonodo sentinela no melanoma fino ($\leq 1\text{mm}$) não é um consenso. Determinadas características do microestadiamento patológico do melanoma cutâneo são utilizadas para a definição de condutas. O infiltrado linfocitário tumoral (ILT) está sendo reconhecido como um possível fator prognóstico, que pode ser utilizado no manejo inicial do paciente com melanoma cutâneo.

Objetivos: determinar a relação entre a presença do infiltrado linfocitário tumoral e o comprometimento metastático do linfonodo sentinela (LS) no melanoma cutâneo primário (MCP) fino.

Material e Métodos: os dados foram obtidos em um único centro oncológico de referência, no Laboratório de Patologia da Santa Casa de Porto Alegre. Foi realizado um estudo transversal, no qual 812 registros de pacientes com melanoma foram revisados e classificados (todas as espessuras de melanoma encontram-se nesse grupo). As variáveis aferidas foram infiltrado linfocitário tumoral (ausente, leve, moderado e acentuado), níveis de Breslow e de Clark, presença e número de mitoses, ulceração, regressão, satelitose, localização, sexo, idade e forma de apresentação. Como desfecho principal, o comprometimento metastático do linfonodo sentinela foi o objetivo.

Resultados: foram avaliados 137 melanomas cutâneos primários (MCP) finos, dentre os quais 10 (7,3%) apresentaram LS comprometido. O ILT moderado/acentuado mostrou um $RR=0,20$ (0,05 – 0,72 IC 95%, $p=0,014$) para a presença de metástase no LS. A ulceração apresentou $RR=12,8$ (2,77 – 59,4 IC 95%, $p=0,001$) para o comprometimento do LS.

Conclusão: a presença de ILT moderado ou acentuado configurou um fator protetor para o LS no MCP fino. Dessa forma, o ILT pode ser utilizado como mais um critério do microestadiamento patológico do MCP na indicação da pesquisa do LS.

Palavras-chave: Melanoma. Linfonodo sentinela. Infiltrado linfocitário. Melanoma fino. Melanoma cutâneo primário. Pesquisa de linfonodo.

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRIA DO MELANOMA

Para uma melhor compreensão da evolução do diagnóstico e tratamento do melanoma, uma sucinta sequência de descrições, ao longo da história, pode elucidar o tema (Selby, 1956; Urteaga, 1966; Cabanas, 1977; Alex, 1993; Ezra, 2010; Rebecca, 2012). A progressão exponencial do conhecimento gerado sobre essa patologia consegue representar a própria evolução da medicina, da cirurgia e da oncologia:

- Múmias peruanas com 2400 anos com lesões ósseas: suspeita-se que sejam implantes secundários de melanoma;
- Século V A.C.: credita-se a Hipócrates a primeira menção ao melanoma, citada no *Ebers Papyrus*;
- 1787: John Hunter REM
- oveu o primeiro melanoma (implante submandibular) – espécime preservado no Royal College of Surgeons of England;
- 1806: René Laennec (inventor do estetoscópio) descreveu o melanoma como uma patologia;
- 1820: William Norris descreveu o melanoma na literatura inglesa e iniciou conceitos de epidemiologia, evolução da doença e, principalmente, metastatização;
- 1844: Samuel Cooper reconheceu o benefício de uma remoção cirúrgica precoce e a natureza intratável do melanoma em casos avançados;
- 1857: Jonathan Hutchinson descreveu o melanoma subungueal e iniciou a publicação da revista *Archives of Surgery*;
- 1863: Rudolf Virchow descreveu o infiltrado linfocitário tumoral;
- 1892: Herbert Snow publicou na revista *Lancet* a necessidade de realizar a linfadenectomia eletiva no tratamento do melanoma;
- 1907: William Handley publicou recomendações que guiaram o tratamento do melanoma por décadas, como margens de uma polegada (2,54cm) sempre seguidas de linfadenectomia;
- 1948: Sophie Spitz reconheceu a ulceração como fator prognóstico;

- 1949: sob a filosofia cirúrgica da radicalidade, Bowers sugeriu a quarterectomia (desarticulações que incluem toda a base escapular e da região ilíaca) para tratamento do melanoma de membros;
- 1949: Moore e Foote descreveram o efeito benéfico do infiltrado linfocitário como “um desajuste entre hóspede e hospedeiro”, desencadeando as pesquisas em imunoterapia oncológica;
- 1969: Wallace Clark relacionou os níveis de invasão da pele com tratamentos e prognóstico;
- 1970: Alexander Breslow definiu a espessura do melanoma como a principal característica do melanoma – utilizada até hoje como a base para todos os trabalhos sobre a patologia;
- 1972: Vincent McGovern iniciou a participação da Austrália nos trabalhos sobre melanoma e registrou, de forma independente, a espessura como fator prognóstico;
- 1977: Ramon Cabanas conceituou e demonstrou o linfonodo sentinela através de uma linfografia;
- 1993: James Alex associou a linfocintilografia na biópsia do linfonodo sentinela, com uso de gama probe intraoperatório;
- 2011: o tratamento do melanoma metastático foi revolucionado com terapias alvo e anticorpos monoclonais através de dois novos agentes: inibidor da BRAF – vemurafenib; e anticorpo anti-CDL4 – ipilimumab.

1.2 MELANOMA CUTÂNEO PRIMÁRIO: CONCEITUAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

O melanoma cutâneo primário (MCP) é uma neoplasia maligna que se origina dos melanócitos (células produtoras de melanina – responsável pela cor da pele – e que se encontram na camada basal da epiderme) (INCA, 2016).

A incidência mundial estimada para 2016 do melanoma é de aproximadamente 232.000 novos casos e uma mortalidade imediatamente superior a 55 mil casos (WHO, 2012). Segundo estatística do INCA (2016), projetam-se para o ano de 2016 5.670 novos casos de melanoma no Brasil, sendo 3.000 homens e 2.670 mulheres.

A região sul do Brasil detém 14,4% da população do País (IBGE, 2010) e, em contrapartida, abrigará 33% dos novos casos de melanoma previstos para 2016, aproximando-se dos mais altos índices mundiais dessa neoplasia. No caso particular do Rio Grande do Sul, a taxa de incidência estimada para o ano de 2016 é de aproximadamente 8 novos casos por 100.000 habitantes (Figura 1), semelhante às mais altas taxas da Europa, ficando atrás apenas da América do Norte, Austrália e Nova Zelândia (IARC).

Tabela 1 - Estimativa de incidências de neoplasias malignas para o Brasil em 2016

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	61.200	61,82	13.940	64,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.960	56,20	18.990	79,37
Colo do Útero	-	-	-	-	16.340	15,85	4.550	19,07
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	17,49	4.430	20,59	10.890	10,54	3.230	13,49
Cólon e Reto	16.660	16,84	5.560	25,80	17.620	17,10	6.210	25,95
Estômago	12.920	13,04	3.130	14,54	7.600	7,37	2.180	9,07
Cavidade Oral	11.140	11,27	2.780	12,95	4.350	4,21	1.230	5,04
Laringe	6.360	6,43	1.600	7,50	990	0,94	320	0,97
Bexiga	7.200	7,26	2.110	9,79	2.470	2,39	830	3,21
Esôfago	7.950	8,04	1.460	6,75	2.860	2,76	610	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.150	5,95	2.170	8,92
Linfoma de Hodgkin	1.460	1,46	450	1,74	1.010	0,93	400	1,33
Linfoma não Hodgkin	5.210	5,27	1.550	7,15	5.030	4,88	1.670	7,02
Glândula Tireoide	1.090	1,08	350	1,27	5.870	5,70	1.800	7,46
Sistema Nervoso Central	5.440	5,50	1.290	5,86	4.830	4,68	1.250	5,20
Leucemias	5.540	5,63	1.370	6,38	4.530	4,38	1.180	4,88
Corpo do Útero	-	-	-	-	6.950	6,74	2.530	10,47
Pele Melanoma	3.000	3,03	840	3,86	2.670	2,59	740	2,96
Outras Localizações	51.850	52,38	11.890	55,45	47.840	46,36	11.820	49,33
Subtotal	214.350	216,48	52.750	245,63	205.960	199,57	61.710	257,55
Pele não Melanoma	80.850	81,66	17.370	80,90	94.910	91,98	21.910	91,65
Todas as Neoplasias	295.200	298,13	70.120	326,51	300.870	291,54	83.620	348,99

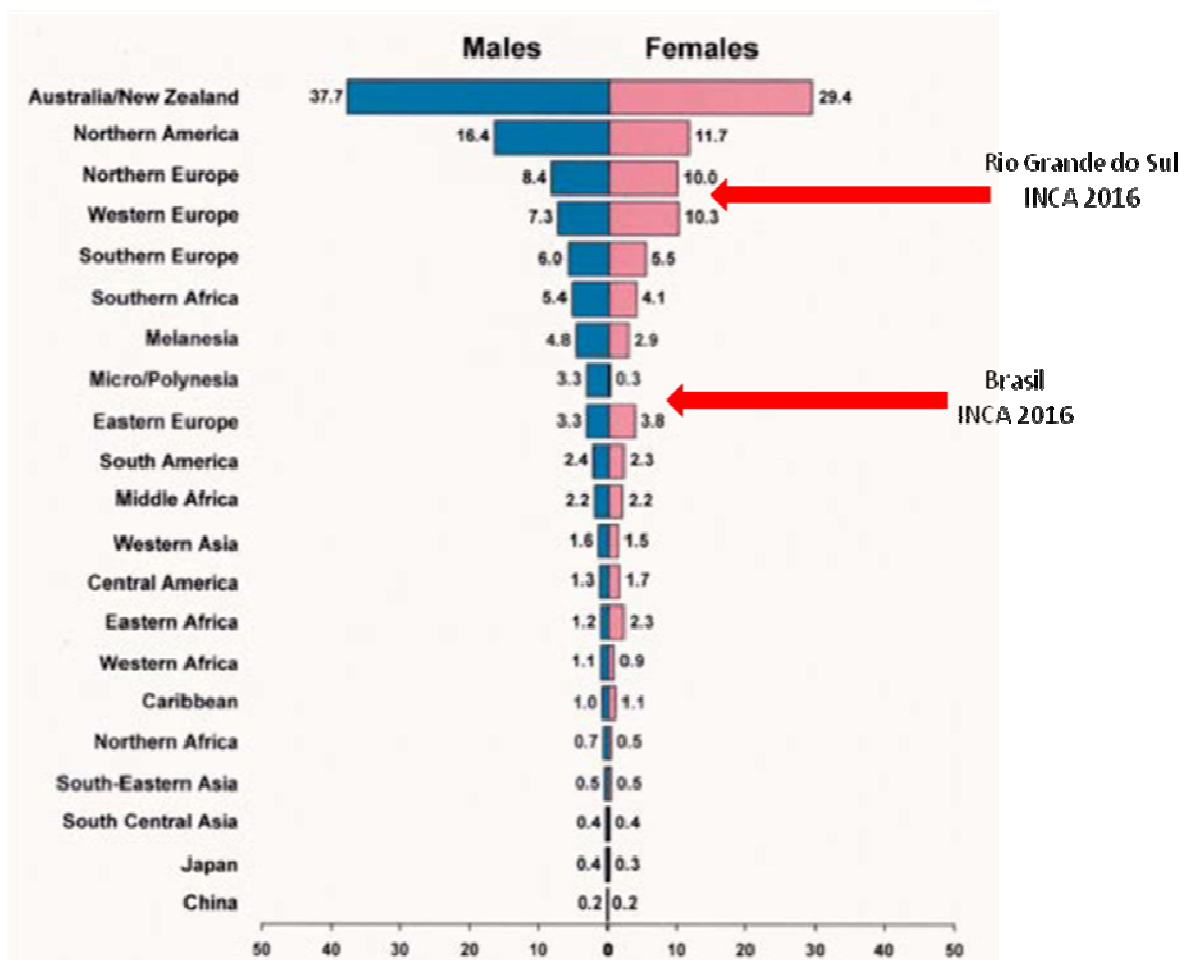
Fonte: Adaptado de INCA, 2016

Tabela 2 - Estimativa de incidências de neoplasias malignas para o Estado do Rio Grande do Sul em 2016

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capital		Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	6.000	109,59	870	126,85	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	5.210	90,20	1.040	130,99
Colo do Útero	-	-	-	-	870	15,14	150	19,47
Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.640	48,16	350	50,89	1.600	27,67	300	38,13
Cólon e Reto	1.510	27,56	290	42,67	1.680	29,13	370	46,66
Estômago	830	15,17	110	16,48	510	8,86	90	10,95
Cavidade Oral	900	16,45	130	19,00	210	3,63	40	4,99
Laringe	660	12,03	80	12,10	90	1,57	**	1,49
Bexiga	600	10,90	110	16,67	250	4,34	50	6,05
Esôfago	1.100	20,13	100	14,26	400	6,98	40	5,48
Ovário	-	-	-	-	460	7,96	110	13,28
Linfoma de Hodgkin	200	3,66	30	4,58	100	1,68	20	1,97
Linfoma não Hodgkin	540	9,83	90	13,34	480	8,35	120	15,04
Glândula Tireoide	150	2,82	30	5,15	310	5,34	50	6,39
Sistema Nervoso Central	630	11,45	70	9,97	540	9,29	80	9,98
Leucemias	540	9,81	80	11,51	440	7,61	80	9,79
Corpo do Útero	-	-	-	-	350	6,02	110	14,52
Pele Melanoma	440	8,02	60	9,41	410	7,06	60	7,45
Outras Localizações	7.720	141,02	1.180	171,38	6.530	112,98	1.050	132,48
Subtotal	24.460	446,59	3.000	436,07	20.440	353,89	3.770	474,18
Pele não Melanoma	7.770	141,81	650	94,22	5.660	97,97	550	69,56
Todas as Neoplasias	32.230	588,45	3.650	530,56	26.100	451,89	4.320	543,36

Fonte: Adaptado de INCA, 2016

Figura 1 - Comparação das incidências de melanoma no mundo com as estimativas de incidências de melanoma para o Brasil e para o Rio Grande do Sul em 2016



Fonte: Adaptado de WHO, 2012; INCA, 2016

1.3 FATORES DE RISCO

Existe uma tendência de surgimento do melanoma sobre nevos pré-existentes, devido ao fato de que estes já possuem genes mutados relacionados à proliferação celular (Cohen e cols., 2002). Essa neoplasia tem uma incidência maior na população de origem caucasiana (pele clara) e também possui como fatores de risco a exposição excessiva à radiação solar e sem a devida proteção – um comportamento cultural (Gandini e cols., 2005, Duquia e cols., 2007) –, história familiar gerando uma propensão genética (Newton e Gruis, 2007) e múltiplos nevos associados a nevos atípicos (Lucas e cols., 2006; INCA, 2016). O comportamento de procura à exposição solar sazonal realizada por massas populacionais e a busca de

bronzearmento através de câmaras de bronzearmento também são fatores de risco bem definidos para o surgimento de melanoma (Gandini e cols., 2005).

1.4 ESTADIAMENTO DO MELANOMA

O estadiamento patológico e a classificação do estágio clínico são compostos através do conjunto de informações obtidas a partir de exame clínico, biópsia da lesão inicial, avaliação do *status* linfonodal (linfonodo sentinela ou linfadenectomia) e avaliação de implantes metastáticos à distância (exames de imagem ou com resultado anatomopatológico obtido por biópsia/resseccção). A revisão da American Joint Committee on Cancer (AJCC) ajustou todas essas informações em 2010, na sua 7ª edição, utilizando características do microestadiamento (ulceração e mitoses) e dosagem sérica de desidrogenase láctica (LDH) para completar as subclassificações. O manejo da lesão inicial suspeita deve ser feito, preferencialmente, por biópsia excisional, pois é a única forma de estabelecer com precisão o estadiamento T (Balch e cols., 2009).

Tabela 3 - Classificação do Melanoma TNM

Estadiamento patológico		
T	Espessura em mm	Ulceração/mitoses
<i>T in situ</i>	Não se aplica	Não se aplica
T1	≤1,00	a: sem ulceração e mitoses <1/mm ² b: com ulceração ou mitoses ≥1/mm ²
T2	1,01 a 2,00	a: sem ulceração b: com ulceração
T3	2,01 a 4,00	a: sem ulceração b: com ulceração
T4	>4,00	a: sem ulceração b: com ulceração
N	Nº de linfonodos metastáticos	Massa linfonodal metastática
N0	0	Não se aplica
N1	1	a: micrometástase b: macrometástase
N2	2 a 3	a: micrometástase b: macrometástase c: Satelitose ou metástase em trânsito sem linfonodo(s) metastático(s)
N3	≥4 ou Satelitose ou metástase em trânsito + linfonodo(s) metastático(s)	-
M	Sítio	LDH sérico
M0	Ausente	Não se aplica
M1a	Lesões à distância em pele, subcutâneo ou linfonodos	Normal
M1b	Metástases pulmonares	Normal
M1c	Qualquer outra metástase visceral Qualquer metástase à distância	Normal Elevado

Fonte: Adaptado de Balch e cols., 2009

Tabela 4 - Estadiamento clínico

Estágio	Estágio clínico		
	T	N	M
0	T <i>in situ</i>	0	0
IA	T1a	0	0
IB	T1b e T2a	0	0
IIA	T2b e T3a	0	0
IIB	T3b e T4a	0	0
IIC	T4b	0	0
III	Qualquer T	≥1	0
IV	Qualquer T	Qualquer N	1

Fonte: Adaptado de Balch e cols., 2009

1.5 PROGNÓSTICO

A necessidade de um diagnóstico precoce no melanoma é imperativa tendo em vista a redução significativa da sobrevida conforme progredirem os estágios da doença. O Linfonodo sentinela (LS) constitui o principal fator prognóstico nos casos iniciais dessa patologia (Sloot e Koshenkov, 2016). Dessa forma, pacientes no estágio clínico I podem ter uma chance de sobrevida de 5 anos superior a 90%. Por outro lado, a presença de metástase linfonodal caracteriza o estágio clínico III e, nessa situação, a sobrevida de 5 anos reduz para 46%. Isso explica o fato de os tumores classificados como T1 pela AJCC (melanomas finos, ou seja, ≤ 1 mm de espessura), corresponderem a até 25% dos óbitos devidos ao melanoma (Hieken e cols., 2015; Bello e cols., 2016).

Tabela 5 - Sobrevida conforme estágio clínico do melanoma

Estágio	Sobrevida de 2 anos	Sobrevida de 5 anos
	(%)	(%)
I	99	92
II	88	67
III	71	46
IV	11	0

Fonte: Adaptado de Mariani e cols., 2002

1.6 SEGUIMENTO DOS PACIENTES COM MELANOMA

A execução de um adequado programa de seguimento dos pacientes oncológicos compõe um dos pilares do manejo do melanoma, juntamente com a prevenção, o diagnóstico e o tratamento.

Não existem protocolos universalmente aceitos para o seguimento de pacientes com melanoma, porém é consenso que, em estágios mais avançados, uma rotina frequente de consultas com exame físico e exames de imagem seja necessária (Fields e Coit, 2011).

No estudo de Garbe e cols. (2003), foi classificada a primeira recorrência como precoce (assintomática) ou tardia (sintomática), e o maior índice de sobrevida foi na recorrência precoce (76% VS. 38%), de 3 anos.

É aconselhado um seguimento com especialista em melanoma (dermatologista, cirurgião oncológico ou oncologista) para consulta clínica com exame de pele e cadeias linfáticas regionais, a cada de 3 a 6 meses nos primeiros 2 a 5 anos; e, por mais 5 anos, deve-se realizar essas consultas a cada 6 a 12 meses. Exames laboratoriais não são indicados, e exames de imagem são solicitados conforme avaliação do paciente (Dummer e cols., 2010; Coit e cols., 2016).

1.7 LINFONODO SENTINELA

1.7.1 História e evolução do linfonodo sentinela

O linfonodo sentinela (LS) é o primeiro linfonodo responsável pela drenagem linfática do local acometido pelo melanoma, a partir do qual ramifica-se a cadeia linfática subsequente. Ele é responsável, em caso de disseminação neoplásica linfonodal, por abrigar o primeiro linfonodo metastático. Dessa forma, pode-se inferir que, se o linfonodo sentinela está livre de metástases, o restante da cadeia linfática também se encontra livre de neoplasia (Reintgen e cols., 1994).

A técnica da biópsia seletiva guiada apresenta fácil reprodutibilidade e oferece uma redução significativa na morbidade comparativamente à linfadenectomia convencional; representou um grande avanço como técnica cirúrgica menos invasiva

e elevada acurácia em detectar o linfonodo sentinela – algumas séries apontam até 98% de sucesso na identificação do LS (Morton, 1997).

A primeira denominação de linfonodo sentinela ocorreu no tratamento de carcinoma de pênis, em 1977, através da infiltração de solução com contraste (Cabanas, 1977). A utilização pioneira de linfocintilografia através de um radioisótopo (coloide de tecnécio-99) e pesquisa de LS com o uso de gama probe em melanoma aconteceu em 1993 (Alex e cols., 1993).

A realização de uma linfadenectomia seletiva guiada (pesquisa de linfonodo sentinela), comparativamente à linfadenectomia regrada, consegue diagnosticar mais micrometástases por fornecer material em menor quantidade, mais específico e direcionado ao patologista – ao contrário do segundo procedimento anteriormente citado, no qual dezenas de linfonodos e uma quantidade significativa de tecido subcutâneo/adiposo têm que ser minuciosamente avaliados no exame anatomopatológico (Doubrovsky e cols., 2004).

Figura 2 - Linfografia para determinar o linfonodo sentinela



Fonte: Adaptado de CABANAS, 1977

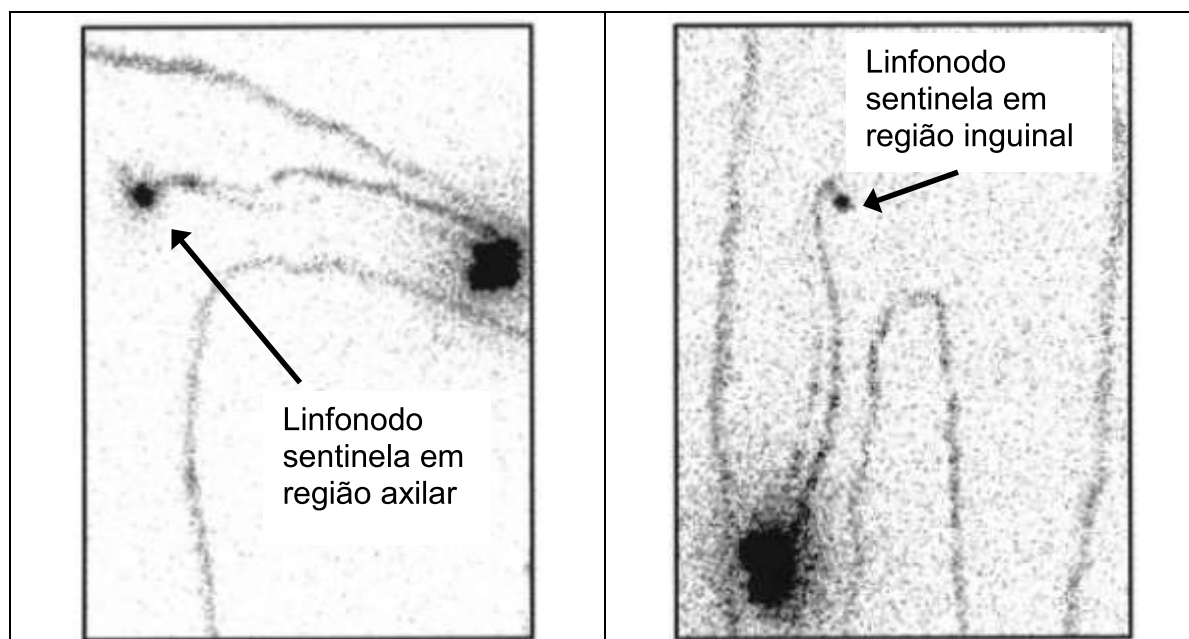
Nota: primeira linfografia após infiltração de contraste em vaso linfático no pênis.

A técnica da biópsia seletiva guiada apresenta fácil reprodutibilidade e oferece uma redução significativa na morbidade comparativamente à linfadenectomia

convencional e representou um grande avanço como técnica cirúrgica por ser menos invasiva e de elevada acurácia em detectar o linfonodo sentinela. Desde a associação da linfocintilografia (em conjunto com o uso do gama probe intraoperatório) ao azul patente, a partir de 1993 (Alex e cols., 1993; Uren e cols., 2015), a identificação do LS pode chegar a 98% (Morton, 1997; Harlow e cols., 2001; Peek e cols., 2016). Apesar de aparentemente simples, o sucesso na execução da pesquisa do LS depende de uma equipe multidisciplinar (cirurgião, patologista, radiologista-medicina nuclear) trabalhando em conjunto (Messina e cols., 2015), principalmente para a detecção do LS em locais de drenagem linfática errática, nos quais a linfocintilografia é imprescindível devido ao envolvimento de outras cadeias linfonodais, além da considerada inicialmente como padrão. A morbidade relacionada à biópsia do linfonodo sentinela (SLNB) apresenta-se na forma de seroma, linfedema, linforreia, infecção, lesão nervosa ou hematoma, podendo chegar a 11,3% – a principal complicação é o seroma (5%) (Moody e Söderman, 2016).

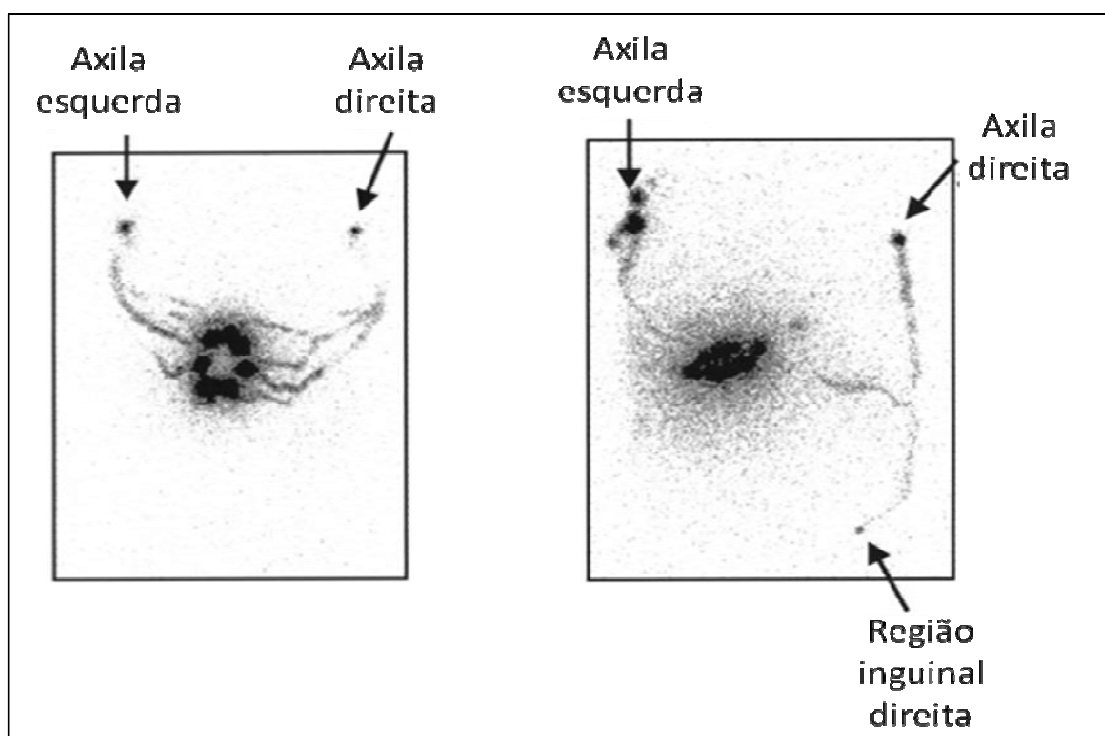
Na abordagem do melanoma, a linfocintilografia tem papel fundamental no planejamento cirúrgico. Nas lesões de extremidades, a drenagem linfática dirige-se para a axila ou a região inguinal ipsilateral. Entretanto, a linfocintilografia pode evidenciar linfonodos na região poplíteia e epitrocLEAR, indicando a necessidade de abordagem cirúrgica desses locais. Nas lesões de cabeça, pescoço e tronco, a drenagem linfática pode ultrapassar limites da linha média e apresentar um padrão menos previsível; nessas situações, a linfocintilografia é indispensável (Mariani e cols., 2002).

Figura 3 - Linfocintilografia de membros com drenagem linfática padrão



Fonte: Adaptado de Mariani e cols., 2002

Figura 4 - Linfocintilografia de tronco com padrão errático de drenagem



Fonte: Adaptado de Mariani e cols., 2002

1.7.2 Indicações de realização do linfonodo sentinela no MCP fino

A indicação da biópsia do linfonodo sentinela no melanoma cutâneo fino (≤ 1 mm) é controversa. Alguns autores consideram baixa a chance de implantes linfonodais nesse grupo, em especial quando a espessura é menor que 0,75mm (Jacobs e cols., 2003; Wong, 2006; Vermeeren e cols., 2010; Han e cols., 2012; Han e cols., 2013; Doepker e cols., 2015).

Por outro lado, há autores que têm difundido a indicação da SLNB baseados no que segue:

- o LS é o principal fator prognóstico nos estágios iniciais (estágios I e II de acordo com a AJCC) (Karakousis e cols., 2007, Mandalà e cols., 2009);
- a importância da informação produzida para o estadiamento e prognóstico do paciente e o baixo risco cirúrgico tornam um imperativo tal realização (Stitzenberg e cols., 2004; Koskivuo e cols., 2007; Phan e cols., 2009);
- Fearfield e cols. (2001) relatam de 2 a 18% de recidiva em até 11 anos quando a espessura é menor que 0,76mm;
- Andtbacka e cols. (2009) interpretam que 5,1% de LS positivos em MCP finos constituem justificativa suficiente para universalizar a respectiva pesquisa;
- fornece adequado controle local de doença (Wong e cols., 2012);
- pacientes de alto risco: ulceração, mitose, satelitose, Clark IV ou V (Wong e cols., 2012; Coit e cols., 2013). O valor limítrofe de Breslow, para ser usado como ponto de corte na indicação de SLNB no melanoma fino, é um assunto controverso, pois existem autores que o indicam em espessuras a partir de 0,5mm (Murali e cols., 2012), bem como no limite de 0,8mm (Venna e cols., 2013). Entre 0,76 e 1,0mm, o LS pode estar comprometido desde 4,5% dos casos (Cordeiro e cols., 2016) a até 11% (Yonick e cols., 2011).

1.7.3 Linfadenectomia após LS positivo no MCP fino

Após um resultado positivo de SLNB, a subsequente linfadenectomia regrada de seu sítio é criticada por alguns autores (Nagaraja e cols., 2013; Sondak e cols., 2013, Morton e cols., 2014), pois não há evidência de ganho na sobrevida global, independentemente do estágio clínico do melanoma. Tendo em vista o melhor

controle local da doença e a complementação do estadiamento linfonodal (Bleicher e cols., 2003; Wong e cols., 2012; Solmaz e cols., 2014), além de gerar ganho de sobrevida livre de doença (Kyrgidis e cols., 2015) e de sobrevida livre de recorrência (Costa e cols., 2016) em melanomas intermediários e espessos, a indicação de linfadenectomia complementar está estabelecida. Entretanto, para os melanomas finos, esses estudos não relatam os benefícios da linfadenectomia após SLNB positivo.

1.7.4 Sistemática da pesquisa do linfonodo sentinela

A detecção do linfonodo sentinela baseia-se na sua marcação, através de duas técnicas concomitantes, pré e transoperatórias, a fim de identificá-lo com precisão e guiar o cirurgião para a devida ressecção (Harlow e cols., 2001). A técnica do azul patente consiste na infiltração deste em de 2 a 3 mL intradérmicos na periferia da cicatriz da biópsia excisional, de forma lenta e cautelosa, a fim de não gerar pequenos acúmulos de corante, pois, quanto mais superficial e intradérmico (não aprofundar a punção e acabar por infiltrar a hipoderme), melhor será a migração do fármaco através dos vasos linfáticos, com algumas poucas horas de antecedência ao procedimento cirúrgico subsequente (ampliação de margens e biópsia seletiva guiada); sua drenagem proporcionará coloração nos vasos linfáticos e linfonodos. Associa-se à infiltração de fármaco radioativo cuja drenagem poderá ser mensurada por um detector portátil de radiação gama durante o ato operatório, e também à realização de imagem da drenagem linfática subsequente – linfocintilografia (Morton e cols., 1992; Scolyer e cols., 2008).

A sequência de fotos a seguir, provenientes do arquivo pessoal do pesquisador, tem a finalidade de mostrar o passo a passo da biópsia do linfonodo sentinela executado em uma paciente jovem, descendente de alemães, na qual foi realizada uma biópsia excisional de um melanoma em região pré-auricular (a indicação da ressecção após dermatoscopia), com Breslow 0,8mm, Clark III, uma mitose/mm², não ulcerado, ausência de satelitose ou ulceração – não foi informado infiltrado linfocitário presente. O resultado do LS foi negativo, e a paciente está em acompanhamento.

Figura 5 - Azul patente que será infiltrado na derme pericicatricial, de 2 a 3 ml, em de 4 a 6 pontos uniformemente distribuídos



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 6 - Paciente no preparo imediato pré-operatório, já sob anestesia geral, podendo-se verificar a cicatriz pré-auricular esquerda e o local de marcação do linfonodo sentinela realizado pela equipe da Medicina Nuclear; também são visíveis os múltiplos nevos em face e a região cervical



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 7 - Marcação dos limites da ampliação a ser realizada sobre cicatriz (margens de 0,5cm devido ao Breslow menor que 1mm) e delimitação da incisão (em pontilhado) cervical no local a ser dissecado o linfonodo sentinela



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 8 - Resultado pós-infiltração de azul patente (essa região é massageada por 5 minutos para adequada drenagem linfática do corante) e finalização dos limites da ampliação de margens em formato navicular com o objetivo de fechamento primário sem realização de enxerto ou retalho – houve discreto *rash* cutâneo devido à manipulação, sem reação alérgica ao corante



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 9 - Resultado após ampliação de margens (com preservação de ramo mandibular do nervo facial) e dissecação do linfonodo sentinela guiado pelo corante azul patente e através do gama probe – o corante remanescente é metabolizado e desaparece em alguns dias



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 10 - Teste de captação máxima do gama probe afastado da área cirúrgica (seguido de novo escaneamento cervical para descartar a presença de mais um linfonodo sentinela remanescente), contagem do detector ao fundo da foto.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 11 - Resultado final do pós-operatório imediato



Fonte: Arquivo pessoal

1.8 INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL

O patologista Rudolf Virchow, em 1863, foi o primeiro a descrever o ILT (Mantovani e cols., 2008; Schatton e cols., 2014). Moore e cols (1949) relacionaram de forma pioneira o infiltrado como um “desajuste” entre o hospedeiro e o tumor (de mama) e acabaram criando, dessa forma, a base para o entendimento de que o hospedeiro (paciente) está tentando se defender do hóspede (tumor – melanoma) através de uma resposta imunológica mediada principalmente pelos linfócitos.

A compreensão do ILT foi concomitante à evolução da imunoterapia para tumores (mama, rim e melanoma), entre 1992 e 1994 (Rosenberg, 1999), bem como a uma melhor resposta dos pacientes com ILT presente, nos casos de melanoma espesso, ao tratamento com interferon (Rao e cols., 2010).

Um dos principais mecanismos de ação do ILT é o reconhecimento de células T citotóxicas perante receptores HLA do melanoma, caracterizando uma terapia-alvo e justificando as áreas de regressão tumoral e a evolução clínica mais favorável

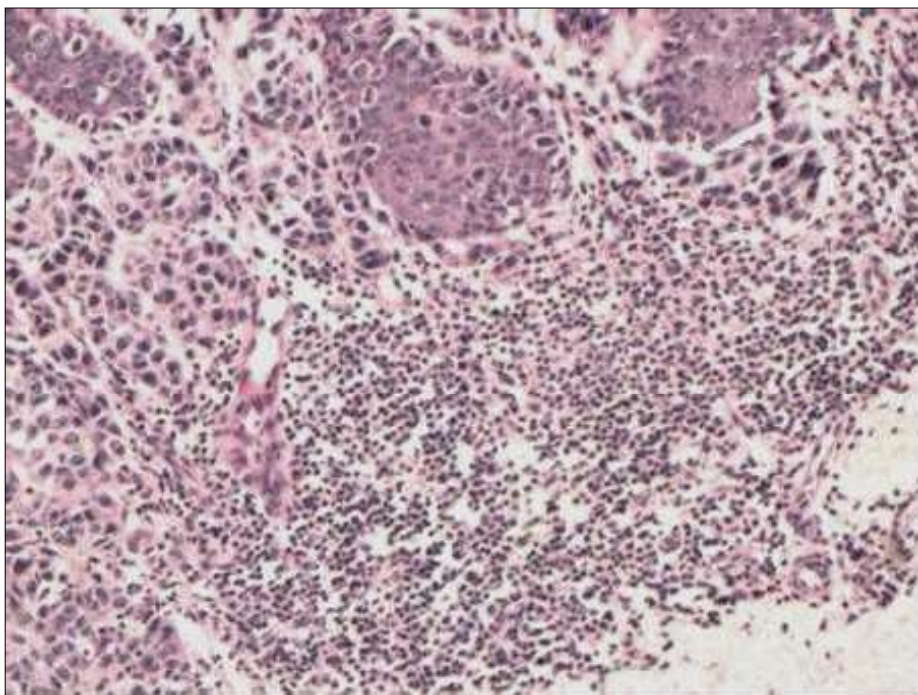
perante casos sem ILT (Hussein, 2005; Cipponi e cols., 2011). Os mecanismos de funcionamento do ILT não são conhecidos, tampouco a composição exata de sua variedade de linfócitos (Hillen e cols., 2008; Oble e cols., 2009).

Apesar de alguns estudos não visualizarem o benefício do ILT na sobrevida (Taylor e cols., 2007; Burton e cols., 2011), trabalhos com número mais alto de pacientes creditaram à ausência do ILT um risco maior para o LS (Duprat e cols., 2016), incluindo os estágios iniciais da doença (Mozzillo e cols., 2013). Os trabalhos (Clemente e cols., 1996; Mandalà e cols., 2009; Tuthill e cols., 2012; Thomas e cols., 2013, Martin e cols., 2015) configuraram uma nova fase na importância do ILT, pois creditaram ao infiltrado uma relação direta com o comprometimento do LS e definiram seu poder prognóstico elevando-o ao mais alto grau de relevância dentre as características do microestadiamento.

A primeira descrição da intensidade do ILT (como *brisk* – ativo), em lesões primárias e metástases dérmicas, foi criada por Kornstein e cols. (1983). A classificação da atividade do TIL permaneceu a mesma durante aproximadamente 30 anos, desde a sua categorização em *brisk* e *non-brisk* por Elder e cols. (1985), até a proposta de uma nova classificação apresentada com o acréscimo de mais um nível na atividade linfocitária, portanto uma padronização de TIL leve, moderado e acentuado (Azimi e cols., 2012).

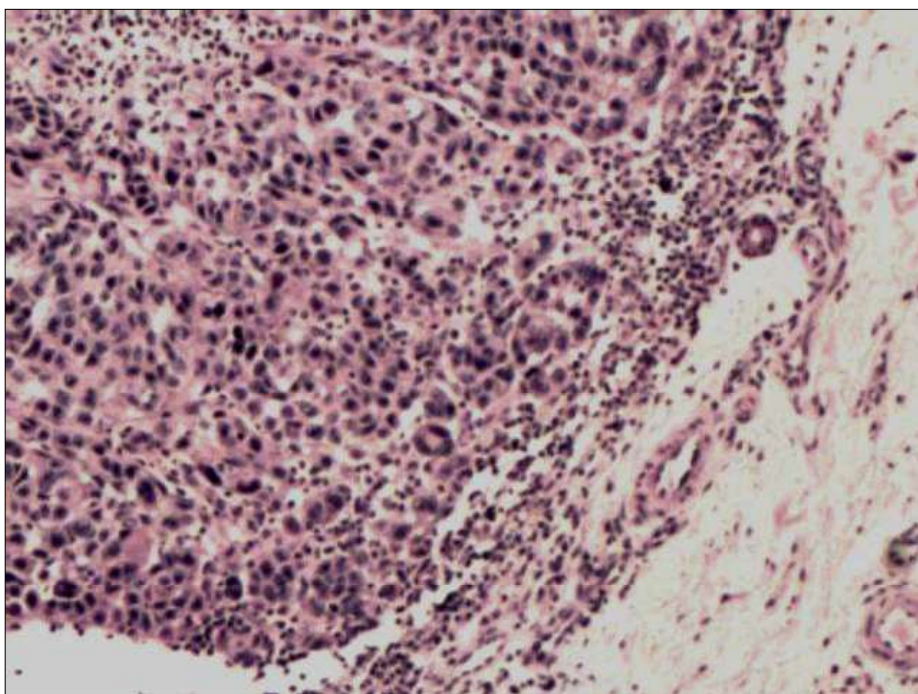
A seguir, imagens de ILT em diferentes intensidades, provenientes do Laboratório de Patologia da Santa Casa de Porto Alegre (RS):

Figura 12 - Infiltrado linfocitário tumoral acentuado



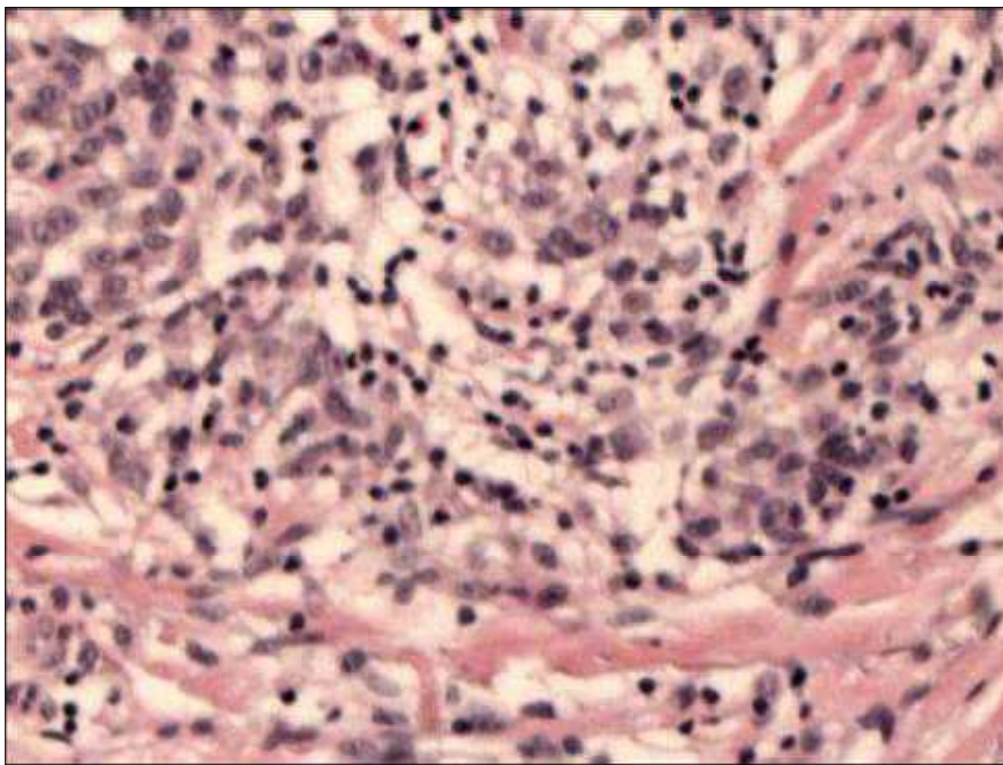
Fonte: Arquivo pessoal Dr. Roque Furian – Co-orientador

Figura 13 - Infiltrado linfocitário tumoral moderado



Fonte: Arquivo pessoal Dr. Roque Furian – Co-orientador

Figura 14 - Infiltrado linfocitário tumoral leve



Fonte: Arquivo pessoal Dr. Roque Furian – Co-orientador

1.9 REFERÊNCIAS

- ALEX, J. C.; WEAVER, D. L.; FAIRBANK, J. T.; RANKIN, B. S.; KRAG, D. N. Gamma-probe-guided lymph node localization in malignant melanoma. *Surg Oncol.* 1993;2(5):303-308.
- ANDTBACKA, R. H.; GERSHENWALD, J. E. Role of sentinel lymph node biopsy in patients with thin melanoma. *J Natl Compr Canc Netw.* 2009 Mar;7(3):308-17.
- AZIMI, F.; SCOLYER, R. A.; RUMCHEVA, P.; MONCRIEFF, M.; MURALI, R.; MCCARTHY, S. W. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2012 Jul;30(21):2678-83.
- BALCH, C. M.; GERSHENWALD, J. E.; SOONG, S.; THOMPSON, J. F.; ATKINS, M. B.; BYRD, D. R.; *et al.* Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol.* 2009;27:6199–6206.
- BLEICHER, R. J.; ESSNER, R.; FOSHAG, L. J.; WANEK, L. A.; MORTON, D. L. Role of sentinel lymphadenectomy in thin invasive cutaneous melanomas. *J Clin Oncol.* 2003 Apr;21(7):1326-31.
- BELLO, D. M.; HAN, G.; JACKSON, L.; BULLOCH, K.; ARIYAN, S.; NARAYAN, D. *et al.* The prognostic significance of sentinel lymph node status for patients with thick melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2016 Aug 15.
- BURTON, A. L.; ROACH, B. A.; MAYS, M. P.; CHEN, A. F.; GINTER, B. A.; VIERLING, A. M. *et al.* Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in melanoma. *Am Surg.* 2011 Feb;77(2):188-92.
- CABANAS, R. M. An approach to the treatment of penile carcinoma. *Cancer.* 1977;39:456-66.
- CIPPONI, A.; WIEERS, G.; VAN BAREN, N.; COULIE, P. G. Tumor-infiltrating lymphocytes: apparently good for melanoma patients. But why? *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Aug;60(8):1153-60.
- CLEMENTE, C. G.; MIHM, M. C.; BUFALINO, R. J.; ZURRIDA, S.; CASCINELLI, N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer.* 1996 Apr;77(7):1303-1310.
- COHEN, C.; ZAVALA-POMPA, A.; SEQUEIRA, J. H.; SHOJI, M.; SEXTON, D. G.; COTSONIS, G.; *et al.* Mitogen-actives protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res.* 2002 Dec;8(12):3718-3733.

COIT, D. G.; OLSZANSKI, A. J. Progress in the management of melanoma in 2013. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* 2013;11:645–648.

COIT, D.G.; THOMPSON, J. A.; ALGAZI, A.; ANDTBACKA, R.; BICHAKJIAN. C. K.; CARSON, W. E. 3RD. *et al.* Melanoma, Version 2.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2016 Apr;14(4):450-73.

CORDEIRO, E.; GERVAIS, M. K.; SHAH, P. S.; LOOK HONG, N. J.; WRIGHT, F. C. Sentinel lymph node biopsy in thin cutaneous melanoma: A systematic review and meta-analysis. *Ann Surg Oncol.* 2016 Dec;23(13):4178-4188.

COSTA, S. F.; SPANOPOULOS, D.; TAYLOR, A.; AMELIO, J.; HANSSON, J. Surgical outcomes in patients with cutaneous malignant melanoma in Europe - a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016 Aug 31.

DOEPKER, M. P.; ZAGER, J. S. Sentinel lymph node mapping in melanoma in the twenty-first century. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015 Apr;24(2):249-60.

DOUBROVSKY, A.; DE WILT, J. H.; SCOLYER, R. A.; MCCARTHY, W. H.; THOMPSON, J. F. Sentinel node biopsy provides more accurate staging than elective lymph node dissection in patients with cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2004 Sep;11(9):829-36.

DUMMER, R.; HAUSCHILD, A.; GUGGENHEIM, M.; JOST, L.; PENTHEROUDAKIS, G.; ESMO Guidelines Working Group. Melanoma: Esmo Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2010 May;5:194-7.

DUPRAT, J. P.; BRECHTBÜLH, E. R.; COSTA, S. B.; ENOKIHARA, M.; FREGNANI, J. H.; LANDMAN, G. *et al.* Absence of tumor-infiltrating lymphocyte is a reproducible predictive factor for sentinel lymph node metastasis: a multicenter database study by the brazilian melanoma group. *PLoS One.* 2016 Feb 9;11(2):e0148160.

DUQUIA, R. P.; MENEZES, A. M. B.; REICHERT, F. F.; ALMEIDA JÚNIOR, H. L. Prevalence and associated factors with sunscreen use in Southern Brazil: A population-based study. *J Am Acad Dermatol.* 2007 Jul;57(1):73-80.

ELDER, D. E.; GUERRY, D. 4TH.; VANHORN, M.; HURWITZ, S.; ZEHNGEBOT, L.; GOLDMAN, L. I. *et al.* The role of lymph node dissection for clinical stage I malignant melanoma of intermediate thickness (1.51-3.99 mm). *Cancer.* 1985;56(2):413-8.

EZRA, N., RABIE, J.. The advent of a novel diagnosis: melanoma through the ages. *Skinmed.* 2010 May-Jun;8(3):172-4.

FEARFIELD, L. A.; ROWE, A.; FRANCIS, N.; FISHER, C.; GORE, M. E.; BUNKER C. B. Clinico- pathological features of relapsing very thin melanoma. *Clin Exp Dermatol.* 2001 Nov;26(8):686-95.

FIELDS, R. C.; COIT, D. G. Evidence-based follow-up for the patient with melanoma. *Surg Oncol Clin N Am.* 2011 Jan;20(1):181-200.

GANDINI, S.; SERA, F.; CATTARUZZA, M. S.; PASQUINI, P.; ABENI, D.; BOYLE, P.; *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*. 2005 Jan;41(1):28-44.

GARBE, C.; PAUL, A.; KOHLER-SPÄTH, H.; ELLWANGER, U; STROEBEL, W.; SCHWARZ, M. *et al.* Prospective evaluation of a follow-up schedule in cutaneous melanoma patients: recommendations for an effective follow-up strategy. *J Clin Oncol*. 2003 Feb;21(3):520-9.

HAN, D.; ZAGER, J. S.; SHYR, Y.; CHEN, H.; BERRY, L. D.; IYENGAR, S. *et al.* Clinicopathologic predictors of sentinel lymph node metastasis in thin melanoma. *J Clin Oncol*. 2013 Dec;10(31-35):4387-93.

HAN, D.; YU, D.; ZHAO, X.; MARZBAN, S. S.; MESSINA, J. L.; GONZALEZ, R. J.; CRUSE, C. W. Sentinel node biopsy is indicated for thin melanomas ≥ 0.76 mm. *Ann Surg Oncol*. 2012 Oct;19(11):3335-42.

HARLOW, S. P.; KRAG, D. N.; ASHIKAGA, T.; WEAVER, D. L.; MEIJER, S. J.; LOGGIE, B. W. *et al.* Gamma probe guided biopsy of the sentinel node in malignant melanoma: a multicentre study. *Melanoma Res*. 2001 Feb;11(1):45-55.

HIEKEN, T. J.; GROTZ, T. E.; COMFERE, N. I.; INSELMAN, J. W.; HABERMANN, E.B. The effect of the AJCC 7th edition change in T1 melanoma substaging on national utilization and outcomes of sentinel lymph node biopsy for thin melanoma. *Melanoma Res*. 2015 Apr;25(2):157-63.

HILLEN, F.; BAETEN, C. I.; VAN DE WINKEL. A. Leukocyte infiltration and tumor cell plasticity are parameters of aggressiveness in primary cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2008 Jan;57(1):97-106.

HUSSEIN, M. R. Tumour-infiltrating lymphocytes and melanoma tumorigenesis: an insight. *Br J Dermatol*. 2005 Jul;53(1):18-21.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sinopse do censo demográfico 2010. 2010. Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?dados=5&uf=00>>. Acesso em: 3 jun. 2016.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa | 2016 – Incidência de Câncer no Brasil. 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>. Acesso em: 3 jul 2016.

JACOBS, I. A.; CHANG, C. K.; DASGUPTA, T.K.; SALTI, G. I. Role of sentinel lymph node biopsy in patients with thin (<1 mm) primary melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2003 Jun;10(5):558-61.

KARAKOUSIS, G. C.; GIMOTTY, P. A.; CZERNIECKI, B. J.; ELDER, D. E.; ELENITSAS, R.; MING, M. E. Regional nodal metastatic disease is the strongest predictor of survival in patients with thin vertical growth phase melanomas: a case for SLN Staging biopsy in these patients. *Ann Surg Oncol*. 2007 May;14(5):1596-603.

Kyrgidis A, Tzellos T, Mocellin S, Apalla Z, Lallas A, Pilati P, *et al.* Sentinel lymph node biopsy followed by lymph node dissection for localised primary cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 May 16;(5):CD010307.

KORNSTEIN, M. J.; BROOKS, J. S.; ELDER, D. E. Immunoperoxidase localization of lymphocyte subsets in the host response to melanoma and nevi. *Cancer Res.* 1983 Jun;43(6):2749-53.

KOSHENKOV, V. P.; BROUCEK, J.; KAUFMAN, H. L. Surgical Management of Melanoma. *Cancer Treat Rev.* 2016;167:149-79.

KOSKIVUO, I.; TALVE, L.; VIHINEN, P.; MÄKI, M.; VAHLBERG, T.; SUOMINEN, E. Sentinel lymph node biopsy in cutaneous melanoma: a case-control study. *Ann Surg Oncol.* 2007 Dec;14(12):3566-74.

LUCAS, R.; MCMICHAEL, T.; SMITH, W.; ARMSTRONG, B. Solar ultraviolet radiation: global burden of disease from solar ultraviolet radiation. In: PRUSS-USTUN, A.; ZEEB, H.; MATHERS, C.; REPACHOLI, M. (Eds.). *Environmental Burden of Disease.* Geneva, Switzerland; Who, 2006. p.1-250.

MANDALÀ, M.; IMBERTI, G. L.; PIAZZALUNGA, D.; BELFIGLIO, M.; LABIANCA, R.; BARBERIS, M. *et al.* Clinical and histopathological risk factors to predict sentinel lymph node positivity, disease-free and overall survival in clinical stages I-II AJCC skin melanoma: outcome analysis from a single-institution prospectively collected database. *Eur J Cancer.* 2009 Sep;45(14):2537-45.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):436-44.

MARIANI, G.; GIPPONI, M.; MORESCO, L.; VILLA, G.; BARTOLOMEI, M.; MAZZAROL, G. *et al.* Radioguided sentinel lymph node biopsy in malignant cutaneous melanoma. *J Nucl Med.* 2002 Jun; 43(6):811-827.

MARTIN, C.; MIHM, JR. M. D.; FACP AND DR. JAMES J. MULÉ. Reflections on the Histopathology of Tumor-infiltrating Lymphocytes in Melanoma and the Host Immune Response. *Cancer Immunol Res.* 2015 Aug; 3(8):827–835.

MESSINA, J. L.; ROSA, M. Pathologic evaluation of sentinel nodes. *Cancer J.* 2015 Jan/Feb; 21(1):33-8.

MOODY, J. A.; ALI, R. F.; CARBONE, A. C.; SINGH, S.; HARDWICKE, J. T. Complications of sentinel lymph node biopsy for melanoma - A systematic review of the literature. *Eur J Surg Oncol.* 2016 Jul 11.

MOORE J. O.; FOOTE J. F. W. The relatively favorable prognosis of medullary carcinoma of the breast. *Cancer.* 1949 Jul; 2(4)635-42.

MORTON, D. L. Sentinel lymphadenectomy for patients with clinical stage I melanoma. *J Surg Oncol.* 1997 Dec;66(4)267-9.

MORTON, D.L.; THOMPSON, J. F.; COCHRAN, A. J.; MOZZILLO, N.; NIEWEG, O. E.; ROSES, D. F. *et al.* Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. *N Engl J Med.* 2014;370:599–609.

MORTON, D.L.; WEN, D. R.; WONG, J. H.; ECONOMOU, J. S.; CAGLE, L. A.; STORM, K. *et al.* Technical Details of Intraoperative Lymphatic Mapping for Early Stage Melanoma. *Arch Surg.* 1992;127(4):392-399.

MOZZILLO, N.; PENNACCHIOLI, E.; GANDINI, S.; CARACÒ, C.; CRISPO, A.; BOTTI, G. *et al.* Sentinel node biopsy in thin and thick melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2013 Aug;20(8):2780-6.

MURALI, R.; HAYDU, L. E.; QUINN, M. J.; SAW, R. P.; SHANNON, K.; SPILLANE, A. J. *et al.* Sentinel lymph node biopsy in patients with thin primary cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 2010 Jan;255(1):128-33.

NAGARAJA, V.; ESLICK, G. D. Is complete lymph node dissection after a positive sentinel Lymph node biopsy for cutaneous melanoma always necessary? A meta-analasis. *Eur J Surg Oncol.* 2013 Jul;39(7):669-80.

NEWTON, J. A.; GRUIS, N. A. Genetics: what advice for patients who present with a family history of melanoma? *Semin Oncol.* 2007 Dec;34(6):452-9.

OBLE, D. A.; ROBERT, L. R.; YU, P.; MIHM JR, M. C. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immunity.* 2009 Apr;9(3):3.

PEEK, M. C.; CHARALAMPOUDIS, P.; ANNINGA, B.; BAKER, R.; DOUEK, M. Blue dye for identification of sentinel nodes in breast cancer and malignant melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Future Oncol.* 2016 Aug 31.

PHAN, G. Q.; MESSINA, J. L.; SONDAK, V. K.; ZAGER, J. S. Sentinel Lymph Node Biopsy for Melanoma: Indications and Rationale. *Cancer Control.* 2009 Jul;16(3):234-9.

RAO, U. N. M.; LEE, S. J.; LUO, W.; MIHM, M. C. JR, KIRKWOOD, J. M. Presence of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and a Dominant Nodule Within Primary Melanoma Are Prognostic Factors for Relapse-Free Survival of Patients With Thick (T4) Primary Melanoma. *Am J Clin Pathol.* 2010 Apr;133(4):646-653.

REBECA, V.W.; SONDAK, V.K.;SMALLEY, K.S. A brief history of melanoma: from mummies to mutations. *Melanoma Res.* 2012 Apr;22(2):114-22.

REINTGEN, D.; CRUSE, C. W.; WELLS, K.; BERMAN, C.; FENSKE, N.; GLASS, F. *et al.* The orderly progression of melanoma nodal metastases. *Ann Surg.* 1994 Dec;220((6):759-67.

ROSENBERG, S. A. A New Era for Cancer Immunotherapy Review Based on the Genes that Encode Cancer Antigens. *Immunity.* 1999 Mar;10(3):281-7.

SCHATTON, T.; SCOLYER, R. A.; THOMPSON, J. F.; MIHM, M. C. JR. Tumor-infiltrating lymphocytes and their significance in melanoma prognosis. *Methods Mol Biol.* 2014;1102:287-324.

SCOLYER, R. A.; MURALI, R.; SATZGER, I.; THOMPSON, J. F. The detection and significance of melanoma micrometastases in sentinel nodes. *Surg Oncol.* 2008 Set;17(3):165-74.

SELBY, H.M.; SHERMAN, R.S.;PACK, G.T. A roentgen study of bone metastases from melanoma. *Radiology.* 1956 Aug;67(2):224-8.

SLOOT, S.; SPEIJERS, M. J.; BASTIAANNET, E.; HOEKSTRA, H. J. Is there a relation between type of primary melanoma treatment and the development of intralymphatic metastasis? A review of the literature. *Cancer Treat Rev.* 2016 Apr;45:120-8.

SÖDERMAN, M.; THOMSEN, J. B.; SORENSEN, J. A. Complications following inguinal and ilioinguinal lymphadenectomies: a meta-analysis. *J Plast Surg Hand Surg.* 2016 May;5:1-6.

SOLMAZ, N. L.; AMIE, C.; STACY, T.; VINAYA, S.; HOWARD, S.; ALEX, K. W. Update and Review on the Surgical Management of Primary Cutaneous Melanoma. *Healthcare (Basel).* 2014 Jun;2(2):234–249.

SONDAK, V. K.; WONG, S. L.; GERSHENWALD, J. E.; THOMPSON, J. F. Evidence-based clinical practice guidelines on the use of sentinel lymph node biopsy in melanoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2013.

STITZENBERG, K. B.; GROBEN, P. A.; STERN, S. L.; THOMAS, N. E.; HENSING, T. A.; SANSBURY, L. B. *et al.* Indications for lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy in patients with thin melanoma (Breslow thickness < or =1.0 mm). *Ann Surg Oncol.* 2004;11(10):900-6.

TAYLOR, R. C.; PATEL, A.; PANAGEAS, K. S.; BUSAM, K. J.; BRADY, M. S. Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2007;25(7):869-75.

THOMAS, N. E.; BUSAM, K. J.; FROM, L.; KRICKER, A.; ARMSTRONG, B. K.; ANTON-CULVER, H. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. *J Clin Oncol.* 2013;31:4252–4259.

TUTHILL, R. J.; UNGER, J. M.; LIU, P. Y.; FLAHERTY, L. E.; SONDAK, V. K. Risk assessment in localized primary cutaneous melanoma: a Southwest Oncology Group study evaluating nine factors and a test of the Clark logistic regression prediction model. *Am J Clin Pathol.* 2002 Oct;118(4):504-11.

UREN, R. F.; HOWMAN-GILES, R.; CHUNG, D.; THOMPSON, J. F. Imaging sentinel lymph nodes. *Cancer J.* 2015 Jan;21(1):25-32.

URTEGA, O.;PACK, G.T.On the antiquity of melanoma. *Cancer*. 1966 May;19(5):607-10966.

VENNA, S. S.; THUMMALA, S.; NOSRATI, M.; LEONG, S. P.; MILLER, J. R. 3RD.; SAGEBIEL, R. W. *et al*. Analysis of sentinel lymph node positivity in patients with thin primary melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2013 Apr;68(4):560-7.

VERMEEREN, L.; VAN DER ENT, E.; SASTROWIJOTO, P.; HULSEWÉ, K. Sentinel lymph node biopsy in patients with thin melanoma: occurrence of nodal metastases and its prognostic value. *Eur J Dermatol*. 2010;20(1):30-4.

WHO – World Health Organization. Globocan 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx>. Acesso em: 24 set. 2016.

WONG, S. L.; BALCH, C. M.; HURLEY, P.; AGARWALA, S. S.; AKHURST, T. J.; COCHRAN, A. *et al*. Sentinel lymph node biopsy for melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology joint clinical practice guideline. *Ann Surg Oncol*. 2012 Oct;19(11):3313-24.

WONG, S.L.; BRADY, M. S.; BUSAM, K. J.; COIT, D. G. Results of sentinel lymph node biopsy in patients with thin melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2006 Mar;13(3):302-9.

YONICK, D. V.; BALLO, R. M.; KAHN, E.; DAHIYA, M.; YAO, K.; GODELLAS. C. *et al*. Predictors of positive sentinel lymph node in thin melanoma. *Am J Surg*. 2011 Mar;201(3)324-7.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

O objetivo primário deste estudo é caracterizar a relação entre o ILT, e suas subsequentes intensidades, com o comprometimento metastático do linfonodo sentinela no melanoma cutâneo primário fino ($\leq 1\text{mm}$).

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

O conjunto de dados obtidos permitirá avaliar, também, as demais variáveis clínicas (sexo, idade, localização, apresentação da lesão inicial) e patológicas do microestadiamento (espessura de Breslow, nível de profundidade de Clark, ulceração, regressão, satelitose e mitose) com o comprometimento do linfonodo sentinela no MCP fino.

3 ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Relation between tumor-infiltrating lymphocytes and sentinel lymph node positivity in thin melanoma

Fernando De Marco dos Santos

Abstract

Background: Determine the relationship between the presence of tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) and metastatic involvement sentinel lymph node biopsy (SLNB) in thin (≤ 1 mm) primary cutaneous melanoma (PCM).

Methods: We have conducted a cross-sectional study in a single Cancer Centre in the South of Brazil, about the histopathologic and Immunohistochemical test results of the 812 PCM cases records evaluated since the initial lesion resection. The study was approved by the Ethics and Research Committee of the institution where it was held. The variables measured were presence of TIL (its intensity was categorized into mild, moderate and severe), Breslow thickness in mm, Clark levels, number of mitoses per radial mm^2 , ulceration, regression, satellitosis, location, gender, age and manner of presentation (disseminative, nodular and lentiginous). The main objective was to study the relationship between SLNB positivity and the presence of TIL (and its intensity). The secondary objectives were to compare with the same outcome, other clinical features and microstaging.

Results: 137 thin PCMs were found, among which 10 (7.3%) presented SLNB compromised. Among the variables evaluated, moderate/severe TIL showed an RR = 0.20 (0.05 – 0.72 95% CI, $p = 0.014$) for the presence of metastases in the SLN. The

ulceration presented RR = 12.8 (2.77 - 59.4 CI 95%, p = 0.001) for the compromise of the SLN.

Conclusions: The presence of moderate or severe ILT set up a protective factor, showing an 80% risk reduction for the occurrence of metastases in SLNB in thin PCM and ulceration rose in 12 times the chance of compromise. Therefore, in patients with PCM \leq 1 mm thick, the absence of the ILT or its light presence, as well as ulceration, represent a risk to the lymph node status, configuring an indication to proceed with the surgical staging by performing the SLNB.

Keywords: Melanoma. Cutaneous oncology. Immunopathology.

Introduction

In southern Brazil, the incidence of melanoma is increasing and the estimate for 2016 is of 8 new cases for 100.00 inhabitants¹, similar to the highest European rates being surpassed only by North America, Australia and New Zealand (IARC). The patients evaluated in this study have the same risk factors high incidence regions: population of Caucasian origin (skinned), cultural behavior and seasonal exposure to direct sunlight without proper protection and sunburn events^{2,3}, as well as the search for a tanned skin through tanning beds³, family history generating a genetic propensity⁴ and multiple nevi associated with atypical nevi^{5,1}.

The need for an early diagnosis in melanoma is imperative in view of the significant reduction in survival as progress the stages of the disease. The SLN is the main prognostic factor in early cases of this pathology^{6,7}. That way, patients in clinical stage I may have a chance of survival at 5 years more than 90%. On the other hand,

the presence of metastasis lymph node characterized the clinical stage III and, in this situation, the survival rate at 5 years reduces to approximately 40%. This explains the fact that tumors classified as T1 by the AJCC (American Joint Committee on Cancer) (thin melanomas, i.e. ≤ 1 mm thick), match for up to 25% of deaths due to melanoma^{8,9}.

The sentinel lymph node (LS) is the first lymph node responsible for lymphatic drainage of the site affected by melanoma and, from which branches off the lymphatic chain. It is responsible in case of lymph node cancer spread, by housing the first metastatic lymph node. In this way one can infer that, if the sentinel node is free of metastases, the rest of the chain is also free of lymphatic neoplasm¹⁰.

The sentinel lymph node biopsy in thin cutaneous melanoma (≤ 1 mm) is controversial, as some authors consider low a chance of lymphonodal implants in this group, in particular when less than 0.75 mm thickness^{11, 12, 13, 14, 15, 16}.

On the other hand, some authors are spreading the indication of SLNB based on:

- SLN is the main prognostic factor in the initial stages (stages I and II according to AJCC^{17,18};
- the importance of the information produced for the staging and prognosis of the patient and the low surgical risk makes it imperative to conduct it^{19, 20, 21};
- Fearfield et al.²² reported 2 to 18% of recurrence in up to 11 years, when less than 0.76 mm thickness;
- the authors Andtbacka and Gershenwald²³ interpreted that 5.1% of positive LS in thin PCM is enough justification to universalize its research.
- appropriate local disease control²⁴

- high-risk patients: ulceration, mitosis, satellitosis, Clark IV or V^{24,25}. The borderline value of Breslow, to be used as cut-off in SLNB in thin melanoma indication, is a controversial subject, as there are authors who indicate in thicknesses from 0.5 mm²⁶, as well as limit of 0.8 mm²⁷. Between 1.0 and 0.76 mm LS can be compromised since 4.5% of cases²⁸ up to 11%²⁹.

The technique of selective guided biopsy presents easy reproducibility and offers a significant reduction in morbidity when compared to conventional lymphadenectomy and represented a major breakthrough as for being less invasive surgical technique and high accuracy in detecting Sentinel lymph node. Since the association of lymphoscintigraphy (in conjunction with the use of intraoperative gamma probe) to blue patent from 1993^{30,31}, identification of the SLN can reach 98%^{32, 33, 34}. Although seemingly simple, the success in implementing the SLNB depends on a multidisciplinary team (surgeon, pathologist, radiologist-nuclear medicine) working together³⁵. Morbidity related to SLNB presents itself in the form of seroma, lymphedema, lymphorrhagia, infection, and hematoma or nerve damage and can reach 11.3%, being the main complication the seroma (5%)^{36,37}.

After a positive result of the subsequent SLNB, a subsequent lymphadenectomy ruled of its location is criticized by some authors^{38, 39, 40}, because there is no evidence of gain on overall survival, regardless of clinical stage of melanoma. In view of the better local control of the disease and lymph node staging complementation^{41, 24, 42}, besides generating disease-free survival⁴³ and recurrence-free survival⁴⁴ in intermediate and thick melanomas, lymphadenectomy complement is established. However, for the thin melanomas, these studies do not report the benefits of lymphadenectomy after positive SLNB.

Despite the record in descriptions of the pathologist Rudolf Virchow in 1863^{45,46}, the perception of the beneficial effect of the TIL originated in 1949⁴⁷ and, only in the last decade, there has been a better understanding of the activity of cytotoxic T cells before HLA receptors of melanoma and generating a more favorable clinical evolution^{48,49}. TIL has played a central role in targeted therapy revolution and recent studies are beginning to show that, if the primary lesion of cutaneous melanoma do not undercover infiltration, an increase of lymph node compromise and worse prognosis are related^{50, 51, 52, 53}.

The classification of TIL activity remained the same, for about 30 years, since its categorization by brisk and non-brisk⁵⁴. A new classification was introduced through the addition of another level in lymphocyte activity⁵⁵, therefore a standardization of mild, moderate and severe TIL was proposed.

The main objective of this study was to study the relationship between metastatic sentinel lymph node compromise and the presence of tumor infiltrating lymphocytes (and its intensity). The secondary objectives were to compare with the same outcome, other clinical features and pathological microstaging.

Materials and Methods

A cross-sectional study was conducted on the histopathologic test results, from 2003 to 2015, from 812 patients followed since the removal of the initial lesion of the PCM in a single Cancer Center in southern Brazil. The inclusion criteria of the study were: invasive lesions ≤ 1 mm that were submitted to biopsy of the sentinel lymph node. There was no age limit established. The study was approved by the Ethics and Research Committee of the institution where it was held.

After the diagnosis of Melanoma, obtained by excisional biopsy, patients underwent staging through clinical examination and imaging. In the immediate preoperative the patients are again examined and are part of the study only those cases in which no adenomegaly was found, moving away from the possibility of over indicating SLNB before an indication of existing lymphadenectomy. All SLNB which resulted in negative HE (hematoxylin/eosin), were subjected to immunohistochemistry. All patients diagnosed with secondary implant in their SLNB were systematically subjected to lymphadenectomy.

Clinical and pathological characteristics of microstaging were determined. The variables measured were: the presence of TIL (and if present, the intensity was categorized into mild, moderate and severe⁵⁵), Breslow thickness in mm, Clark levels, number of mitoses per radial mm², ulceration, regression, satellitosis, location, gender, age, form of presentation (disseminative, nodular and lentiginous).

Quantitative variables were expressed as mean and standard deviation or median and interquartile range. Categorical variables were described by absolute and relative frequencies.

To compare means between patients with and without positive SLNB, the Student's t test was applied. In the case of asymmetry, the Mann-Whitney test was used. When comparing proportions, the Fisher exact test (2 x 2 tables) or the chi-square test of Pearson (variables with more than two categories) were applied.

The relative risk in conjunction with the range of 95% confidence interval was calculated to estimate the effect of each factor on the outcome by multivariate Poisson regression. The criteria for the variable entry in the multivariate model was that it presented a p-value <0.20 in the bivariate analysis.

Results

Were assessed 137 thin PCM and submitted to research of LS, among which 10 (7.3%) presented metastatic lymph node involvement. The clinical and pathological variables are detailed in Table 1, and the comparison between the positive and negative SLNB groups showed no difference related to age, gender, location, type, Breslow > 0.76 mm, regression, ulceration, presence and intensity TIL, TIL location satellitosis and mitosis number. Clark levels showed heterogeneous groups, but in multivariate analysis this information is not confirmed nor presented a specific Clark level for positivity of SLNB.

After a multivariate regression analysis only two factors showed statistical significance. Moderate and severe TIL have configured a risk reduction of compromise of the SLN, with RR 0.2 (95% CI 0.02-0.72) $p = 0.014$ and those with ulceration showed a 12.8 times greater risk of metastatization lymph node: RR 12.8 (95% CI 2.77 – 59.4) $p = 0.001$ (table 2).

In 4 cases Breslow was less than 0.76 mm. One of the cases of LS positive classified as low risk (Breslow of 0.38, 1 mitosis per field, moderate peri and intratumoral TIL, regression present, negative clinical examination for adenopathy, ulceration and satellitosis absent) presented 6 metastatic lymph nodes of 6 resected and the emptying of over 25 lymph nodes without neoplasm, characterizing a situation of exception.

The Breslow 0.76 mm was a cutoff point used based on the literature^{28,29} in an attempt to compare the data.

The Breslow 0.76 mm was a cutoff point used based on the literature^{28,29} in an attempt to compare the data. In order to establish a value for the measure related to lymphatic spread in Breslow PCM, the ROC curve showed a trend, not statistically

significant ($p=0,282$), that thicknesses ≥ 0.79 mm would increase the chance of positivity of SLNB.

To a lesser extent of Breslow associated to SLN positive was 0.31 mm. In 4 cases (40%) the identification of metastases in the LS was made only by IHQ. Among patients who underwent ganglia emptying, in 50% of the SLN diagnosed by IHC there was metastatization to other lymph nodes. For the positive sentinel lymphadenectomy found other implants in 66% of cases. The average number of lymph nodes removed in lymphadenectomies was 27.5.

Discussion

The attempt to find a statistical relationship stronger than before the peritumoral intratumoral TIL did not reach statistically significant result. The interpretation of this feature is based on the fact that if the patient generates an immunomediated response approaching lymphocytes to tumor cells, soon, if this answer was more intense and able to permeate the tumor with lymphocytes, it would then result in a situation of slower cancer evolution. Literature has no evidence to support this interpretation and, to measure the intensity of the response of the host it is used, in addition to the intensity of the TIL, the determination of lymphocyte subtypes present in this immunomediated response.

Although ulceration has demonstrated a significantly elevated risk to the positivity of the SLNB, that information must be evaluated very carefully, because the number of cases of ulcerated melanomas was reduced in both groups, limiting the credit that could be given to this trait.

Studies with long follow-up, as Fortes *et al*⁶, showed a reduction in mortality, after 10 years, in patients with TIL in PCM. This benefit also occurs on the SLN,

where there is a significant decrease in the SLNB positivity when TILs are expressed, in melanomas of intermediate thickness (1 to 4 mm) and thick (> 4 mm)^{50,53}. In working Azimi⁵⁵ the beneficial effect of the activity the TIL on the SLN was also demonstrated in a subset of PCM thin (0.75 to 1.0 mm). It shows that the TIL is a manifestation of the host immune response to tumor.

It is very important to consider assistance in practice, that local control of the disease in an early form (SLNB followed by lymphadenectomy), although it doesn't generate gain in overall survival, it can increase the disease-free survival and recurrence pattern, avoiding the ulcerative lymph node metastatic bulky, which characterizes a situation too unwieldy, therapeutic options generally unsatisfactory as well as deep and constant suffering to the patient.

Therefore, the absence of TIL or its presence in low degree constitute a risk factor for positivity of the SLN in thin PCM. That way, TIL can be used in the set of information that will define which thin PCM can benefit from SLNB and, consequently, contribute to a precise definition of prognosis and also generate an adequate local control of the disease.

References

- 1 Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa | 2016** – Incidência de Câncer no Brasil. [internet]. 2016 [access in July, 2015. 03]. Available at: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>

2 Duquia RP, Baptista AM, Reichert FF, de Almeida HL Jr. Prevalence and associated factors with sunscreen use in Southern Brazil: A population-based study. **J Am Acad Dermatol**, 57(1):73-80, jul. 2007.

3 Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. **Eur J Cancer**, 41(1):28-44, jan. 2005.

4 Newton JA, Gruis NA. Genetics: what advice for patients who present with a family history of melanoma? **Semin Oncol**, 34(6):452-9, dec. 2007.

5 Lucas R, McMichael T, Smith W, Armstrong B. Solar Ultraviolet Radiation: Global burden of disease from solar ultraviolet radiation. In: Pruss-Ustun A, Zeeb H, Mathers C, Repacholi M, eds. **Environmental Burden of Disease**. Geneva, Switzerland; Who, 2006. p.1-250.

6 Sloot S, Speijers MJ, Bastiaannet E, Hoekstra HJ. Is there a relation between type of primary melanoma treatment and the development of intralymphatic metastasis? A review of the literature. **Cancer Treat Rev.**, 45:120-8, apr. 2016.

7 Koshenkov VP, Broucek J, Kaufman HL. Surgical Management of Melanoma. **Cancer Treat Rev.**, 167:149-79. 2016.

8 Hieken TJ, Grotz TE, Comfere NI, Inselman JW, Habermann EB. The effect of the AJCC 7th edition change in T1 melanoma substaging on national utilization and

outcomes of sentinel lymph node biopsy for thin melanoma. **Melanoma Res.**, 25(2):157-63, apr. 2015.

9 Bello DM, Han G, Jackson L, Bulloch K, Ariyan S, Narayan D, *et al.* The Prognostic Significance of Sentinel Lymph Node Status for Patients with Thick Melanoma. **Ann Surg Oncol.** 2016 Aug 15.

10 Reintgen D, Cruse CW, Wells K, Berman C, Fenske N, Glass F, *et al.* The orderly progression of melanoma nodal metastases. **Ann Surg** 220(6):759-67, dec. 1994.

11 Han D, Zager JS, Shyr Y, Chen H, Berry LD, Iyengar S *et al.* Clinicopathologic predictors of sentinel lymph node metastasis in thin melanoma. **J Clin Oncol**, 10;31(35):4387-93, dec. 2013.

12 Han D, Yu D, Zhao X, Marzban SS, Messina JL, Gonzalez RJ, *et al.* Sentinel node biopsy is indicated for thin melanomas ≥ 0.76 mm. **Ann Surg Oncol**, 19(11):3335-42, oct. 2012.

13 Vermeeren L, Van Der Ent E, Sastrowijoto P, Hulsewé K. Sentinel lymph node biopsy in patients with thin melanoma: occurrence of nodal metastases and its prognostic value. **Eur J Dermatol**, 20(1):30-4. 2010.

14 Jacobs IA, Chang CK, DasGupta TK, Salti GI. Role of sentinel lymph node biopsy in patients with thin (<1 mm) primary melanoma. **Ann Surg Oncol**, 10(5):558-61, jun. 2003.

15 Wong SL, Brady MS, Busam KJ, Coit DG. Results of sentinel lymph node biopsy in patients with thin melanoma. **Ann Surg Oncol**, 13(3):302-9, mar. 2006.

16 Doepker MP, Zager JS. Sentinel lymph node mapping in melanoma in the twenty-first century. **Surg Oncol Clin N Am**, 24(2):249-60, apr. 2015.

17 Karakousis GC, Gimotty PA, Czerniecki BJ, Elder DE, Elenitsas R, Ming ME. Regional nodal metastatic disease is the strongest predictor of survival in patients with thin vertical growth phase melanomas: a case for SLN Staging biopsy in these patients. **Ann Surg Oncol**, 14(5):1596-603, may. 2007.

18 Mandalà M, Imberti GL, Piazzalunga D *et al.* Clinical and histopathological risk factors to predict sentinel lymph node positivity, disease-free and overall survival in clinical stages I-II AJCC skin melanoma: outcome analysis from a single-institution prospectively collected database. **Eur J Cancer**, 45(14):2537-45, sep. 2009.

19 Phan GQ, Messina JL, Sondak VK, Zager JS. Sentinel Lymph Node Biopsy for Melanoma: Indications and Rationale. **Cancer Control**, 16(3): 234-9, july. 2009.

20 Koskivuo I, Talve L, Vihinen P, Mäki M, Vahlberg T, Suominen E. Sentinel lymph node biopsy in cutaneous melanoma: a case-control study. **Ann Surg Oncol**, 14(12):3566-74, dec. 2007.

21 Stitzenberg KB, Groben PA, Stern SL, Thomas NE, Hensing TA, Sansbury LB, Ollila DW. Indications for lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy in

patients with thin melanoma (Breslow thickness \leq 1.0 mm). **Ann Surg Oncol**. 11(10):900-6, oct. 2004.

22 Fearfield LA, Rowe A, Francis N, Fisher C, Gore ME, Bunker CB. Clinico-pathological features of relapsing very thin melanoma. **Clin Exp Dermatol**, 26(8):686-95, nov. 2001.

23 Andtbacka RH, Gershenwald JE. Role of sentinel lymph node biopsy in patients with thin melanoma. **J Natl Compr Canc Netw**, 7(3):308-17, mar. 2009.

24 Wong SL, Balch CM, Hurley P *et al*. Sentinel lymph node biopsy for melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology joint clinical practice guideline. **Ann Surg Oncol**, 19(11):3313-24, oct. 2012.

25 Coit DG, Olszanski AJ. Progress in the management of melanoma in 2013. **J. Natl. Compr. Cancer Netw**, 11:645–648. 2013.

26 Murali R, Haydu LE, Quinn MJ, Saw RP, Shannon K, Spillane AJ, *et al*. Sentinel lymph node biopsy in patients with thin primary cutaneous melanoma. **Ann Surg**, 255(1):128-33, jan. 2012.

27 Venna SS, Thummala S, Nosrati M, Leong SP, Miller JR 3rd, Sagebiel RW, *et al*. Analysis of sentinel lymph node positivity in patients with thin primary melanoma. **J Am Acad Dermatol**, 68(4):560-7, apr. 2013.

28 Cordeiro E, Gervais MK, Shah PS, Look Hong NJ, Wright FC. Sentinel Lymph Node Biopsy in Thin Cutaneous Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis.

Ann Surg Oncol. 2016 Mar 1.

29 Yonick DV, Ballo RM, Kahn E, Dahiya M, Yao K, Godellas C *et al.* Predictors of positive sentinel lymph node in thin melanoma. **Am J Surg**, 201(3):324-7; discussion 327-8, mar. 2011.

30 Alex JC, Weaver DL, Fairbank, JT, Rankin BS, Krag DN. Gamma-probe-guided lymph node localization in malignant melanoma. **Surg Oncol**, 2(5):303-308. 1993.

31 Uren RF, Howman-Giles R, Chung D, Thompson JF. Imaging sentinel lymph nodes. **Cancer J**, 21(1):25-32, jan.-feb. 2015.

32 Morton DL. Sentinel lymphadenectomy for patients with clinical stage I melanoma. **J Surg Oncol** 66(4):267-9, dec. 1997.

33 Harlow SP, Krag DN, Ashikaga T, Weaver DL, Meijer SJ, Loggie BW *et al.* Gamma probe guided biopsy of the sentinel node in malignant melanoma: a multicentre study. **Melanoma Res**, 11(1):45-55, feb. 2001.

34 Peek MC, Charalampoudis P, Anninga B, Baker R, Douek M. Blue dye for identification of sentinel nodes in breast cancer and malignant melanoma: a systematic review and meta-analysis. **Future Oncol.** 2016 Aug 31.

35 Messina JL, Rosa M. Pathologic evaluation of sentinel nodes. **Cancer J**, 21(1):33-8. jan./feb. 2015.

36 Moody JA, Ali RF, Carbone AC, Singh S, Hardwicke JT. Complications of sentinel lymph node biopsy for melanoma - A systematic review of the literature. **Eur J Surg Oncol**. 2016 Jul 11

37 Söderman M, Thomsen JB, Sørensen JA. Complications following inguinal and ilioinguinal lymphadenectomies: a meta-analysis. **J Plast Surg Hand Surg**, 5:1-6, may. 2016.

38 Nagaraja V, Eslick GD. Is complete lymph node dissection after a positive sentinel Lymph node biopsy for cutaneous melanoma always necessary? A meta-analasis. **Eur J Surg Oncol**, 39(7):669-80, jul. 2013.

39 Sondak VK, Wong SL, Gershenwald JE, Thompson JF. Evidence-based clinical practice guidelines on the use of sentinel lymph node biopsy in melanoma. **Am Soc Clin Oncol Educ Book**. 013. doi: 10.1200/EdBook_AM.2013.33.e320

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

41 Bleicher RJ, Essner R, Foshag LJ, Wanek LA, Morton DL. Role of sentinel lymphadenectomy in thin invasive cutaneous melanomas. **J Clin Oncol**, 1;21(7):1326-31, apr. 2003.

42 Solmaz NL, Amie C, Stacy T, Vinaya S, Howard S, Alex KW. Update and Review on the Surgical Management of Primary Cutaneous Melanoma. **Healthcare (Basel)**, 2(2): 234–249, jun. 2014.

43 Kyrgidis A, Tzellos T, Mocellin S, Apalla Z, Lallas A, Pilati P, *et al.* Sentinel lymph node biopsy followed by lymph node dissection for localised primary cutaneous melanoma. **Cochrane Database Syst Rev**, 16;(5), may. 2015.

44 Costa SF, Spanopoulos D, Taylor A, Amelio J, Hansson J. Surgical outcomes in patients with cutaneous malignant melanoma in Europe - a systematic literature review. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. 2016 Aug 31.

45 Schatton T, Scolyer RA, Thompson JF, Mihm MC Jr. Tumor-infiltrating lymphocytes and their significance in melanoma prognosis. **Methods Mol Biol**. 2014;1102:287-324.

46 Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. **Nature**. 2008 Jul 24;454(7203):436-44.

47 Moore O Jr, Foote FW Jr. The relatively favorable prognosis of medullary carcinoma of the breast. **Cancer**, 2(4):635-42, jul. 1949.

48 Hussein MR. Tumour-infiltrating lymphocytes and melanoma tumorigenesis: an insight. **Br J Dermatol**, 153(1):18-21, jul. 2005.

49 Cipponi A, Wieers G, Van Baren N, Coulie PG. Tumor-infiltrating lymphocytes: apparently good for melanoma patients. But why? **Cancer Immunol Immunother**, 60(8):1153-60, aug. 2011.

50 Duprat JP, Brechtbühl ER, Costa SB, Enokihara M, Fregnani JH, Landman G *et al*. Absence of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Is a Reproducible Predictive Factor for Sentinel Lymph Node Metastasis: A Multicenter Database Study by the Brazilian Melanoma Group. **PLoS One**. 2016 Feb 9;11(2).

51 Mozzillo N, Pennacchioli E, Gandini S, Caracò C, Crispo A, Botti G *et al*. Sentinel node biopsy in thin and thick melanoma. **Ann Surg Oncol**, 20(8):2780-6, aug. 2013.

52 Thomas NE, Busam KJ, From L, Kricker A, Armstrong BK, Anton-Culver H, *et al*. Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. **J Clin Oncol**, 31:4252–4259. 2013.

53 Martin CM, James JM. Reflections on the Histopathology of Tumor-infiltrating Lymphocytes in Melanoma and the Host Immune Response. **Cancer Immunol Res**, 3(8): 827–835, aug. 2015.

54 Elder DE, Guerry D 4th, VanHorn M, Hurwitz S, Zehngebot L, Goldman LI, *et al.* The role of lymph node dissection for clinical stage I malignant melanoma of intermediate thickness (1.51-3.99 mm). **Cancer**, 15;56(2):413-8, jul. 1985.

55 Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, Moncrieff M, Murali R, McCarthy SW *et al.* Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. **J Clin Oncol**, 20;30(21):2678-83, jul. 2012.

56 Fortes C, Mastroeni S, Mannooranparampil TJ, Passarelli F *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes predict cutaneous melanoma survival. **Melanoma Res**, 2015 Aug;25(4):306-11.

Table 1 – Patients characteristics and associations with sentinel lymph node metastasis

Variables	Sentinel lymph node metastasis		p
	Yes (n=10; 7.3%)	No (n=127; 92.7%)	
Age (years)	52.1 ± 12.5	53.9 ± 13.4	0,682
Gender – n(%)			0,104
Male	7 (70.0)	53 (41.7)	
Female	3 (30.0)	74 (58.3)	
Location – n(%)			0,533
Lower limbs	0 (0.0)	22 (17.3)	
Trunk	6 (60.0)	61 (48.0)	
Head and neck	2 (20.0)	10 (7.9)	
Upper limbs	2 (20.0)	27 (21.3)	
Vulva	0 (0.0)	1 (0.8)	
Acral	0 (0.0)	6 (4.7)	
Type – n(%)			0,567
Disseminated Superficial	9 (90.0)	113 (89.0)	
Lentiginous	0 (0.0)	8 (6.3)	
Nodular	1 (10.0)	6 (4.7)	
Clark – n(%)			0,005
I	0 (0.0)	1 (0.8)	
II	1 (10.0)	44 (34.6)	
III	5 (50.0)	52 (40.9)	
IV	3 (30.0)	30 (23.6)	
V	1 (10.0)	0 (0.0)	
Breslow – mean ± SD	0.68 ± 0.26	0.65 ± 0.24	0,635
<0.76	5 (50.0)	76 (59.8)	0,740
≥ 0.76	5 (50.0)	51 (40.2)	
TIL intensity – n(%)			0,080

Negative	1 (10.0)	3 (2.4)	
Mild	6 (60.0)	39 (30.7)	
Moderate	3 (30.0)	63 (49.6)	
Severe	0 (0.0)	22 (17.3)	
TIL location – n(%)			0,512
Peritumor	6/9 (66.7)	67/124 (54.0)	
Peritumor & intratumor	3/9 (33.3)	57/124 (46.0)	
Regression – n(%)			0,096
Positive	3 (30.0)	76 (59.8)	
Negative	7 (70.0)	51 (40.2)	
Ulceration – n(%)			0,141
Positive	1 (10.0)	1 (0.8)	
Negative	9 (90.0)	126 (99.2)	
Satellitosis – n(%)			0,505
Positive	1 (10.0)	8 (6.3)	
Negative	9 (90.0)	119 (93.7)	
Mitoses – md (P25 – P75)	1.5 (1 – 2)	1 (1 – 2)	0.257

SD=Standard deviation; md=median; P25=Percentile 25; P75=Percentile 75

Table 2 – Multivariate Poisson regression analysis to evaluate factors independently associated with sentinel lymph node metastasis

Variables	RR (95% CI)	p
Gender		
Male	3.10 (0.75 – 12.9)	0,120
Female	1.00	
Clark		
I/II	1.00	
III	4.43 (0.40 – 49.7)	0,227
IV/V	4.11 (0.28 – 60.4)	0,303
TIL intensity		
Negative/mild	1.0	
Moderate/severe	0.20 (0.05 – 0.72)	0,014
Regression		
Positive	0.63 (0.17 – 2.39)	0,499
Negative	1.00	
Ulceration		
Positive	12.8 (2.77 – 59.4)	0,001
Negative	1.00	

RR=Relative risk; 95% CI: 95% confidence interval.



Relation between tumor-infiltrating lymphocytes and sentinel lymph node positivity in thin melanoma

Journal:	<i>International Journal of Dermatology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	dos Santos, Fernando; Universidade Federal de Ciencias da Saude de Porto Alegre, Pathology; Universidade de Caxias do Sul, Bonamigo, Renan; FFFCMPA, Dermatology Silva, Felipe; Universidade Federal de Ciencias da Saude de Porto Alegre
Keywords:	melanoma, cutaneous oncology, immunopathology

SCHOLARONE™
Manuscripts

view

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, levando em consideração a taxa significativa de comprometimento do LS (7,3% – valor próximo ao encontrado em outros trabalhos) no MCP fino e tendo em vista a significativa piora de prognóstico na presença de implantes no LS, a ausência de TIL ou sua presença em grau leve se constituem fatores de risco. Dessa forma, pode-se usar o ILT no conjunto de informações que vão definir quais MCP finos podem se beneficiar do LS e, conseqüentemente, contribuir para uma definição precisa de prognóstico, necessidade de tratamento adjuvante e adequado controle local da doença.

É muito importante considerar, na prática assistencialista, que o controle local da doença realizado de uma forma precoce (SLNB seguido de linfadenectomia), apesar de não gerar ganho em sobrevida global, consegue elevar a sobrevida livre de doença e de recorrência, evitando um conglomerado linfonodal ulcerado, que caracteriza uma situação de difícil manejo, opções terapêuticas geralmente insatisfatórias, além de sofrimento profundo e constante ao paciente.

5 ANEXOS

5.1 Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: RELAÇÃO ENTRE O INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL E A POSITIVIDADE DO LINFONODO SENTINELA NO MELANOMA CUTÂNEO FINO

Pesquisador: Renan Rangel Bonamigo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 25397413.8.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 653.823

Data da Relatoria: 15/05/2014

Apresentação do Projeto:

RELAÇÃO ENTRE O INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL E A POSITIVIDADE DO LINFONODO SENTINELA NO MELANOMA CUTÂNEO FINO

Objetivo da Pesquisa:

Relacionar a presença de infiltrado linfocitário tumoral com a positividade de metástase no linfonodo sentinela em pacientes com melanoma fino.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

POR TRATAR-SE DE ANÁLISE DE DADOS REGISTRADOS E CRIAÇÃO DE NOVOS ATRAVÉS DE REVISÃO DE LÂMINAS EM LABORATÓRIO, NÃO HÁ RISCOS AOS PACIENTES/POPULAÇÃO.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa possui relevância dentro da área estudada e contribui para ampliar os conhecimentos sobre os estudos da patologia evolvida.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A folha de rosto permanece faltando o preenchimento do campo 15. E a metodologia precisa de maior precisão quanto ao nº amostral investigado. O projeto possui uma estimativa e nos outros

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)303 -8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 653.823

formulários uma estimativa de 120 amostras.

Recomendações:

A metodologia menciona que um levantamento prévio, realizado pela mesma equipe de pesquisadores, evidenciou 110 laudos de pacientes com melanoma cutâneo fino submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela. Esse levantamento tem como base de dados os registros do laboratório de Patologia da Santa Casa de Porto Alegre de 2004 a 2012. Isto é um fato, mas o estudo irá utilizar 100% deste material ?

Precisa ficar mais claro se a pesquisa será feita com 100% das lâminas que correspondem ao diagnóstico pesquisado ou parte deste material.

Ficando este aspecto bem definido no texto, este deverá estar reproduzido no projeto também.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Observar os aspectos apontados no parecer do relator e realizar alterações no projeto e formulários que abordam os pontos observados.

O projeto está aprovado com a condição de correção dos aspectos arrolados neste parecer

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Observamos que os autores não responderam aos questionamento do relator nos pareceres anteriores.

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)303 -8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 653.823

PORTO ALEGRE, 20 de Maio de 2014

Assinado por:
José Geraldo Vernet Taborda
(Coordenador)

5.2 NORMAS DA REVISTA

INTERNATIONAL JOURNAL OF DERMATOLOGY SUBMISSION FORMS

1. ABOUT *IJD*

Published monthly, the *International Journal of Dermatology (IJD)* is specifically designed to provide dermatologists around the world with a regular, up-to-date source of information on all aspects of the diagnosis and management of skin diseases. Accepted articles regularly cover clinical trials, education, morphology, pharmacology and therapeutics, case reports, and reviews. Additional features include tropical medicine reports, news, correspondence, and proceedings and transactions.

IJD is guided by a distinguished, international editorial board and emphasizes a global approach to continuing medical education for physicians and other providers of health care with a specific interest in problems relating to the skin.

2. MANUSCRIPT CATEGORIES

IJD invites the following types of submission:

Case Report*

A report of 400–600 words, illustrated by no more than three illustrations. This category offers a means for rapid communication about a single subject.

Clinical Trial

An article of 700–1200 words concerning a drug evaluation. This category provides rapid publications and is meant to be a succinct presentation with a minimum of graphs and tables.

Commentary*

An editorial 700–1200 words in length with approximately five references. The author may express his or her opinion without complete documentation.

Clinicopathological Challenge*

A photographic essay that includes both a clinical and a pathological photograph in color. The diagnosis and legends for the photographs should be listed after the references in the article. The article should be no more than 2 pages in length and contain 4-5 references.

Correspondence*

Letters to the editor and short notes. Contributions should not exceed 600 words, two figures, and 10 references. In order to offer rapid dissemination of accepted manuscripts, Correspondence items will be published online-only. Online-only correspondence items are assigned to an issue of the journal, but are excluded from the print edition. Online-only correspondence items are e-paginated and are fully citable and indexable.

Dermatological Surgery

An article relating to the surgical aspects of treatment. Article types may include Review, Report or Case Report Format.

Education

An article about the methodology of curriculum and instruction in dermatology, about 2500 words.

Morphology*

A photographic essay that emphasizes one or two photographs, in color. There should be accompanying text and references, but the entire article will appear on one printed page.

On a Human Scale* (by invitation only)

An article that relates to social, economic, cultural, artistic and humanitarian aspects of medicine. The length of the article should not exceed 1200 words including a short summary of the topic addressed. A brief author biography and photo should be submitted with the article. If you have a topic that you feel would fit nicely in this section, please send a note to ijdermatol@mayo.edu for approval to submit.

Pharmacology and Therapeutics

An article relating to the treatment of diseases and to the pharmacology of dermatologically-related drugs. (Can include Clinical Trials, Reviews, Reports, Case Reports and Correspondence. The latter is preferred for reports of adverse drug reactions.) When referring to a drug, please use the generic name approved by the United States Food and Drug Administration or recognized as the United States Adopted Name. At the end of the manuscript, please list the American Trade names.

Reminiscence

An article on the history of dermatology or skin diseases; also a biographic account of an historic or noteworthy figure in dermatology.

Report

An original article including, whenever possible, an Introduction, Materials and Methods or Case Report(s), Results, Comment, and References. A Structured Abstract of not more than 250 words must be included and should consist of four paragraphs labeled Background, Methods, Results, and Conclusions. Also, it should describe the problem studied, how the study was performed, the main results, and what the author(s) concluded from the results. The article should range from 2500-3000 words.

Review

A major didactic article that clarifies and summarizes the existing knowledge in a particular field. It should not be an exhaustive review of the literature, and references should not exceed 50 in number. Tables, diagrams, and selected figures are often helpful and preferred. The length is left to the judgment of the author, although it generally should not exceed 5000 words. Topics may include updates in clinically relevant basic science and cutaneous biology. A list of 10 questions should be listed at the end of the article to provide additional educational challenge to the reader. An abstract is required, though it need not be structured.

Tropical Medicine Rounds

An article dealing with the diseases and special problems encountered by dermatologists working in the tropics. Article submissions should follow the Report or Case Report format.

Updates in Medicine

By invitation only. This contribution to the journal should be 700–1200 words in length with sufficient references to document important points. It is not essential that the contribution be heavily referenced as it is meant to serve as an update for dermatologists in various fields of medicine and is not portrayed to be an extensive or exhaustive review of the literature. However, it would be very helpful if pertinent and salient references are included, not only for documentation purposes, but also for additional reading.

Medical Genetics

Report, Review or Case Report format should be followed.

*No abstract required

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Submissions should be made online at the *IJD* [ScholarOne Manuscripts site](#) (formerly known as Manuscript Central). New users should first create an account (do not upload document files at this time). Once a user is logged onto the site, submissions should be made via the Author Center.

Revised manuscripts must be submitted as revisions as directed by the ScholarOne website. Do not resubmit a revision as a new manuscript as this may result in re-review and considerable delay. The revision should be complete and contain all the tables and figures. Do not resubmit the original manuscript with your revision.

Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time. The author must supply a full statement to the Editor about all submissions and previous reports that might be regarded as redundant or duplicate publication of the same or very similar work.

4. PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts must be written in English and must comply with these instructions in every detail.

Text should be supplied in a word processed format such as Microsoft Word for Windows. Charts and tables are considered textual and should be supplied in the

same format. Figures (illustrations, diagrams, photographs) should be supplied in gif, jpeg, tif or eps format.

All manuscripts must be typed in 12 pt font with lines double spaced and margins of at least 2.5 cm.

Abbreviations must be defined when first used, both in the abstract and in the main text.

Manuscripts must be as succinct as possible. Text must comply with the word and figure limits defined in Section 2. If authors consider that a manuscript should not conform to the limits specified, exceptionally good reasons must be clearly provided in a cover letter accompanying the submission. Repetition of information or data in different sections of the manuscript must be carefully avoided.

Manuscripts should, where appropriate, include:

Title Page

The first page of all manuscripts should contain the following information:

1. the title of the paper;
2. surnames (family names), initials of each author, and their degree (if any);
3. name of the institution(s) at which the research was conducted;
4. name, address, telephone number and email address of corresponding author;
5. manuscript word count (excluding abstract and references), table and figure count;
6. any conflict of interest disclosures (see Section 5);
7. a running head not exceeding 50 characters.

Abstracts

Authors submitting Reports should note that structured abstracts (maximum 250 words) are required. The structured abstract should adopt the format: Background, Methods, Results, Conclusions.

Review articles require abstracts (maximum 250 words) but they need not be structured.

Abstracts should not contain citations.

Text

This should in general, but not necessarily, be divided into sections with the headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Table and figure legends. Figures should be submitted as separate files. The acknowledgements should include a statement of all funding sources that supported the work.

Please submit the full text of the manuscript, including the abstract, references, tables and legends as a single document. The title page may be included as page 1 of the main manuscript document or can be uploaded as a separate file, but must be included.

Tables and Figures

Tables should not be inserted in the appropriate place in the text but should be included at the end of the manuscript, each on a separate page.

Figures (illustrations, diagrams, photographs) should be supplied in gif, jpeg, tif or eps format and submitted as separate electronic files.

Tables and figures should be referred to in text as follows: Fig. 1, Figs. 2–4; Table 1, Tables 2 and 3. The place at which a table or figure is to be inserted in the printed text should be indicated clearly on a manuscript. Each table and/or figure must have a legend that explains its purpose without reference to the text. Where a figure has more than one panel, each panel should be labelled in the top left-hand corner using lower case letters in parentheses i.e. '(a)', '(b)' etc., and a brief description of each panel given in the figure legend. When using histology figures, the stain type and magnification level must be included in the legend.

Only figures of excellent quality will be considered for publication. The Journal will publish color photographs free of charge subject to editorial approval. When an individual is identifiable in a photograph written permission must be obtained (see Section 5 'Ethics' below).

Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce previously published figures or tables.

References

References should be in Vancouver format and appear as consecutive, unbracketed superscript numbers in the text, e.g. 'in our previous reports^{1,2} and those of Smith *et al.*^{3–5}' and should be listed numerically in the reference list at the end of the article.

Format references as below, using standard (Medline) abbreviations for journal titles.

When there are more than four authors, include the first three authors followed by *et al.*

1. de Berker DAR, Baran R, Dawber RPR. The Nail in Dermatological Diseases. In: *Baran and Dawber's Diseases of the Nails and their Management* (Baran R, Dawber RPR, de Berker DAR, Haneke E, Tosti, A, eds), 3rd edn. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2001: 172–92;
2. Murray ML, Cohen JB. Mycophenolate mofetil therapy for moderate to severe atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 2007; 32: 23–7;
3. Graham-Brown R, Burns T. *Lecture Notes: Dermatology*. Oxford: Wiley-Blackwell, 2006;
4. Smith A. (1999) Select committee report into social care in the community [WWW document]. URL <http://www.dhss.gov.uk/reports/report015285.html> [accessed on 7 November 2003].

5. DECLARATIONS

Original Publication

Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time. The author must supply a full statement to the Editor about all submissions and previous reports that might be regarded as redundant or duplicate publication of the same or very similar work.

Conflicts of Interest

Authors are responsible for disclosing all financial and personal relationships between themselves and others that might be perceived by others as biasing their work. To prevent ambiguity, authors must state explicitly whether potential conflicts do or do not exist.

Ethics

When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. Do not use patients' names, initials or hospital numbers, especially in illustrative material. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on, the care and use of laboratory animals was followed. A statement describing explicitly the ethical background to the studies being reported should be included in all manuscripts in the Materials and Methods section. Ethics committee or institutional review board approval should be stated.

Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying information should not be published in written descriptions, photographs and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Identifying details should be omitted if they are not essential but patient data should never be altered or falsified in an attempt to attain anonymity. Complete anonymity is difficult to achieve and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of patients is inadequate protection of anonymity.

Authorship

All persons designated as authors should qualify for authorship and all those who qualify should be listed. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. One or more authors should take responsibility for the integrity of the work as a whole, from inception to published article. Authorship credit should be based only on 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; 3) final approval of the version to be published. Conditions 1, 2 and 3 must all be met. Acquisition of funding, the collection of data or general supervision of the research group, by themselves, do not justify authorship. All others

who contributed to the work who are not authors should be named in the Acknowledgements section.

Committee on Publication Ethics (COPE)

As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE), adherence to these submission criteria is considered essential for publication in IJD; mandatory fields are included in the online submission process to ensure this. If, at a later stage in the submission process or even after publication, a manuscript or authors are found to have disregarded these criteria, it is the duty of the Editor to report this to COPE. COPE may recommend that action be taken, including but not exclusive to, informing the authors' professional regulatory body and/or institution of such a dereliction. The website for COPE may be accessed at: <http://www.publicationethics.org.uk>.

6. ADDITIONAL INFORMATION ON ACCEPTANCE

Author services

Author Services enables authors to track their article—once it has been accepted—through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. The proof can be downloaded as a PDF file from this site. Further instructions will be sent with the proof. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

Early View

IJD is covered by the Publisher's **Early View** service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found online at <http://www.doi.org/faq.html>.

Offprints

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see <http://www.wiley.com/go/nihmandate>.

Contacting the Editorial Office

Professor Rokea A. el-Azhary

Editor-in-Chief

Mayo Clinic E-5A

200 First Street SW

Rochester MN 55905

USA

Tel: +1 507 538-8249

Fax: +1 507 284 2072

E-mail: IntJDerm@gmail.com