

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

Luciana El Halal Schuch

**Avaliação dos Biomarcadores
Kindlin-1 e Ki-67 no Melanoma
Cutâneo Primário**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2016**

Luciana El Halal Schuch

Avaliação dos Biomarcadores Kindlin-1 e Ki-67 no Melanoma Cutâneo Primário

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

Orientador: Prof. Dra. Claudia Giuliano Bica

**Porto Alegre
2016**

Catálogo na Publicação

El Halal Schuch, Luciana
Avaliação dos Biomarcadores Kindlin-1 e Ki-67 no
Melanoma Cutâneo Primário / Luciana El Halal Schuch. --
2016.

56 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de
Pós-Graduação em Patologia, 2016.

Orientador(a): Prof. Dra. Claudia Giuliano Bica.

1. Melanoma cutâneo primário. 2. Marcadores tumorais.
3. Imunohistoquímica. 4. Ki-67. 5. Kindlin. I. Título.

Agradecimentos

À minha orientadora Cláudia Giuliano Bica, um agradecimento especial pela receptividade, amizade e otimismo.

À equipe de pesquisa da professora Cláudia, em especial Giovana Tavares e Munique Mendonça, obrigada pela amizade e pela ajuda sempre amiga.

Agradeço também à equipe do Laboratório de Patologia da Ufcpsa pela disponibilidade e apoio, em especial Keli Reiter, e à equipe do NUPESQ, em especial Cristiane Bundchen.

Um especial agradecimento à minha universidade e aos meus professores, que me acolheram e me inspiraram desde 2002 até agora, passando pelo curso de Medicina, pela residência médica e mestrado. Meu muito obrigado por estas oportunidades e pela excelente formação e preparo.

Por fim, agradeço à minha família e ao meu companheiro João Caron pelo apoio incondicional.

Sumário

1. Introdução	
1.1. Melanoma Cutâneo Primário (MCP)	6
1.2. Epidemiologia do MCP	10
1.3. Marcadores Imunoistoquímicos do MCP	11
1.3.1. Kindlin-1	13
1.3.2. Kindlin-1 e Câncer	14
1.3.3. Ki-67	16
1.3.4. Ki-67 e Lesões Melanocíticas	17
1.4. Referências Bibliográficas	19
2. Objetivos	24
3. Artigo científico redigido em inglês	25
4. Considerações finais	46
5. Anexos	47

Lista de abreviaturas utilizadas

AJCC: American Joint Committee on Cancer

FERMT1: *fermitin family member 1*

HE: hematoxilina-eosina

IHQ: imuno-histoquímica

LAP: peptídeo associado à latência

LDH: lactato desidrogenase

LTBP: proteína de ligação à TGF β

MCP: melanoma cutâneo primário

RGD: tripeptídeo Arg-Gly-Asp

RGP: fase de crescimento radial

T β RI e II: fator de crescimento transformador I e II

Tis: tumor *in situ*

TNM: tumor, nodos regionais, metástases à distância

VGP: fase de crescimento vertical

Resumo da Dissertação

Introdução: O melanoma cutâneo primário (MCP) tem sua previsão prognóstica proposta pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC). Mesmo com muitos estudos nesse sentido, é difícil prever a evolução da doença, pois melanomas com apresentações clínicas e patológicas semelhantes podem ter comportamentos diferentes. O objetivo deste estudo é correlacionar, através da imuno-histoquímica, (IHQ) a expressão de Ki67 e Kindlin-1 em MCP com fatores prognósticos da doença.

Métodos: Estudo de coorte histórica. Utilizando anticorpos monoclonais Kindlin-1 e Ki-67, foi realizada IHQ na peça de MCP de pacientes tratados entre 2006 e 2014 em nossa instituição. As informações sobre dados clínico-patológicos foram recuperados dos prontuários. A análise estatística foi realizada no SPSS versão 23.0.

Resultados: A idade média dos 30 pacientes incluídos foi de $50,93 \pm 15,31$ anos. A expressão de Ki-67 foi detectada em todas as amostras, enquanto que de Kindlin foi negativa em duas. A expressão de Kindlin não foi significativamente correlacionada com a expressão de Ki-67 pela análise de correlação de Spearman ($P = 0,46$), bem como a expressão de ambos os marcadores e o estágio clínico ($P = 0,34$ e $0,18$, respectivamente - tabela 3). Breslow, Clark e taxa mitótica foram significativamente correlacionados com o estadiamento ($P = 0,001$).

Conclusão: O pouco conhecimento referente ao prognóstico do MCP ocorre devido à sua heterogeneidade; por isso, marcadores tumorais são necessários para estratificar os pacientes e estimar probabilidade de progressão. Nosso estudo comparou a expressão por IHQ dos marcadores tumorais Ki-67 e Kindlin-1 com fatores prognósticos de MCP. Porém, não houve correlação entre estes e a expressão dos marcadores Ki-67 ou Kindlin-1. Estudos adicionais são necessários para confrontar nossos achados com a evolução clínica para estipular seu potencial prognóstico.

Palavras-chave: *melanoma cutâneo, marcadores tumorais, Ki-67, Kindlin, imuno-histoquímica*

1. Introdução

1.1 Melanoma cutâneo primário

O melanoma é o tipo de câncer de pele com origem nos melanócitos, sendo uma lesão bem definida histopatologicamente. A etiologia do melanoma cutâneo primário (MCP) é multifatorial. Os fatores etiológicos e predisponentes associados a esta neoplasia são a exposição ao sol e a susceptibilidade genética, os quais podem explicar o aumento da incidência deste câncer na população mundial. O desafio na identificação do MCP está na variabilidade das formas que as lesões podem apresentar durante as primeiras fases da doença, o que retarda o início do tratamento. Nos estágios iniciais, os quais apresentam maiores chances de cura, as lesões malignas podem mimetizar histologicamente as benignas. Dermatologistas seguem o critério ABCDE a fim de reconhecer o desenvolvimento do tumor: **A**ssimetria; **B**ordas irregulares; **C**or; **D**iâmetro (> 6mm); **E**volução (Friedman e cols., 1985; Herman e cols., 2012).

Os melanomas cutâneos passam por duas fases: fase de crescimento radial (RGP) e fase de crescimento vertical (VGP). Na primeira, o tumor pode invadir a epiderme e a derme papilar. Durante a fase subsequente, ocorre a mudança para um estágio mais agressivo. A transição entre a RGP e a VGP é marcada por alterações nas expressões gênicas, as quais são de grande interesse para estudos sobre a progressão da malignidade (Chin e cols., 1998; Lens e cols., 2004; Gallagher e cols., 2005).

Os principais fatores prognósticos do MCP, segundo a classificação da American Joint Committee on Cancer (AJCC) 2009, são baseados na classificação padrão TNM (tumor, nodos regionais, metástases à distância). A

categoria T descreve o estado do tumor primário através de sua espessura, presença de ulceração e taxa mitótica (mitoses / mm²). N significa o grau do envolvimento linfonodal e M define a presença e localização de metástases (tabela 1). A partir do sistema de classificação, foram designados quatro estágios clínicos e patológicos (tabela 2) (Balch e cols., 2009).

Nos estágios iniciais não-metastáticos do câncer, a cirurgia é a principal conduta para o tratamento. Quimioterapia e imunoterapia têm sido estudadas como outras formas de terapia. A quimioterapia tem seus efeitos limitados r.a sobrevivência geral dos pacientes devido a mecanismos quimiorresistentes. Apenas uma pequena subpopulação de pacientes atingem benefícios duráveis a partir da imunoterapia (La Porta e cols., 2007; Rass e cols., 2009; Qin e cols., 2013).

Tabela 1. Classificação TNM para melanoma

Classificação		
T	Espessura de Breslow (mm)	Status da ulceração / mitoses
Tis	NA	NA
T1	≤ 1	a: sem ulceração e taxa mitótica < 1 / mm ² b: com ulceração e taxa mitótica ≥ 1 / mm ²
T2	1,01 – 2,00	a: sem ulceração b: com ulceração
T3	2,01 – 4,00	a: sem ulceração b: com ulceração
T4	> 4,00	a: sem ulceração b: com ulceração
N	Nº de linfonodos metastáticos	
N0	0	NA
N1	1	a: micrometástases ^a b: macrometástases ^b
N2	2 – 3	a: micrometástases ^a b: macrometástases ^b c: metástases em trânsito / satélites sem nodos metastáticos
N3	4 ou mais	
M	Sítio	LDH
M0	Sem metástases à distância	NA
M1a	Metástases na pele, subcutâneas ou nodais	Normal
M1b	Metástases no pulmão	Normal
M1c	Outras metástases viscerais	Normal
	Qualquer metástase à distância	Elevado

Abreviações: Tis, Tumor *in situ*; NA, não se aplica; LDH, lactato desidrogenase.

^aMicrometástases são diagnosticadas depois da biópsia do linfonodo sentinela.

^bMacrometástases são definidas como metástases nodais clinicamente detectáveis e confirmadas patologicamente.

Adaptado de Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, et al. (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 27: 6199–6206.

Tabela 2. Estadiamento do melanoma com base na classificação TNM

	Estadiamento clínico ^a				Estadiamento patológico ^b		
	T	N	M		T	N	M
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	La	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	Lb	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2b	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	LIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
					T14a	N1a	M0
III	Qualquer T	N > N0	M0	IIIA	T14a	N2a	M0
					T14b	N1a	M0
				IIIB	T14b	N2a	M0
					T14a	N1b	M0
				IIIC	T1-4a	N2b	M0
					T14a	N2c	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	IV	T1-4b	N1b	M0
					T14b	N2b	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	IV	T14b	N2c	M0
					Qualquer T	N3	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

^a Estadiamento clínico inclui o microestadiamento do melanoma primário e avaliação clínica/radiológica de metástases.

^b Estadiamento patológico o microestadiamento do melanoma primário e informação patológica do linfonodo regional após *linfadenectomia parcial ou completa*. *Pacientes em estágios patológicos 0 ou IA são exceção, pois não necessitam de avaliação patológica de seus linfonodos.*

Adaptado de Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, et al. (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 27: 6199–6206.

1.2 Epidemiologia do melanoma

O MCP representa a causa mais comum de morte por câncer de pele em escala global. Segundo estimativas da American Cancer Society, o câncer de pele do tipo não melanoma é o mais prevalente entre todos os tipos de neoplasias. A cada ano são reportados mais de três milhões de casos não melanoma e 76.000 melanomas foram registrados apenas em 2014 (Jemal e cols., 2010; Gober e cols., 2012).

O risco de desenvolver tumores de pele do tipo melanoma durante a vida é de um em 50 entre brancos (2%), um em 1.000 entre negros (0,1 %) e um em 200 entre hispânicos (0,5 %). A probabilidade de aparecimento destes tumores tende a aumentar com a idade (maior risco acima de 80 anos), mas o tumor também ocorre em jovens (American Cancer Society, 2016).

Nas últimas três décadas, a incidência de melanoma aumentou consideravelmente – na ordem de cinco vezes – fazendo deste um problema clínico significativo. Nos Estados Unidos, o melanoma é o câncer com a maior taxa de incidência e estima-se que aproximadamente 76.380 casos serão diagnosticados no país durante o ano de 2016, e causará a morte de cerca de 10.130 portadores. No Brasil, o câncer de pele é o mais frequente entre os tumores malignos e o melanoma representa 4 % dessa neoplasia. Entre a população brasileira são estimados 5.890 novos casos da doença, sendo 2.960 em homens e 2.930 mulheres, em 2014. No Rio Grande do Sul, estado brasileiro com um grande número de imigrantes de origem europeia, a taxa bruta de incidência por 100 mil habitantes para 2016 é de 8,02 casos de melanoma em homens e de 7,06 em mulheres, a maior do Brasil (Kreiseder e cols., 2012; Grazziotin e cols., 2013; INCA, 2016; American Cancer Society, 2016).

Quando detectado precocemente, antes do tumor penetrar na epiderme, a taxa de sobrevivência em cinco anos é em torno de 98 %. No entanto, a sobrevida tende a cair drasticamente em pacientes com o estágio avançado da doença. Aqueles com metástases regionais e à distância têm 64 e 16 %, respectivamente, de chance de sobrevida em cinco anos. Por outro lado, pacientes que possuem um conjunto de lesões totalizando entre 1 e 2 mm de espessura e sem ulceração, a sobrevida em 10 anos pode chegar a 80 - 97 % (Jemal e cols., 2008; American Cancer Society, 2016).

1.3 Biomarcadores do melanoma cutâneo primário

Biomarcadores moleculares tumorais podem ser definidos como componentes biológicos – do próprio tumor ou de moléculas relacionados do hospedeiro – os quais podem ser utilizados como indicadores da doença ou de seu prognóstico. Atualmente, o sistema de estadiamento de melanoma do AJCC 2009 reconhece apenas a Lactato Desidrogenase (LDH) como biomarcador molecular para esta neoplasia. Níveis elevados desta proteína no estágio IV da doença estão associados a um pior prognóstico. Foi demonstrado que as taxas de sobrevivência em um e dois anos para pacientes com o estágio IV da doença e níveis normais de LDH foram de 65 e 40 %, respectivamente, enquanto que para pacientes com níveis elevados de LDH foram de apenas 32 e 18 %, respectivamente. Outros fatores também considerados para o estadiamento são a espessura, ulceração e número de mitoses. Porém, melanomas em estágios precoces são clinicamente heterogêneos e 5% dos melanomas em estágio I metastatizam precocemente e têm um prognóstico ruim (Gimotty e cols., 2005; Balch e cols., 2009; Wisco e cols., 2012).

É reconhecido que múltiplos mecanismos celulares estão desregulados

na iniciação e progressão do tumor, como proteínas reguladoras do ciclo celular, apoptoses, transdução de sinais, adesão das células e digestão da matriz. As etapas para a progressão tumoral incluem, geralmente, a conversão de uma lesão pigmentada para a forma de melanoma in situ, que cresce lateralmente na epiderme (RGP). Se não tratado adequadamente, o melanoma pode progredir para a VGP, a qual está associada com invasão da derme e, frequentemente, com o aparecimento de metástases (Clark e cols., 1989; Clark e cols., 1991; Sondak e cols., 2001; Haass e cols., 2005; Meyer e cols., 2012).

As metástases, responsáveis pela grande parte da mortalidade em câncer, ocorrem através de várias etapas, incluindo invasão de células tumorais de tecidos adjacentes, extravasamento para os vasos sanguíneos, micrometástases em locais distantes e, finalmente, crescimento de células tumorais produzindo tumores secundários. Em cada passo, as células cancerígenas passam por obstáculos que se relacionam com alterações moleculares que modificam a expressão e função de genes específicos de metástases. A relação entre relevância clínica e genes relacionados ao pior prognóstico e às metástases é um passo crucial para a identificação de terapias de prevenção e tratamento (Sin e cols., 2011).

Nos últimos anos, a busca por moléculas capazes de prever o rumo provável dessa doença aumentou significativamente. Entretanto, com exceção da LDH, nenhum outro biomarcador proposto se mostrou consistente para utilização como uma ferramenta prognóstica adicional. A identificação precoce dos indivíduos com pior prognóstico da neoplasia permitiria intervenções imediatas e mais agressivas, com possibilidade de aumento de sobrevida do paciente (Wisco e cols., 2012).

Um número significativo de biomarcadores tumorais foram identificados por imuno-histoquímica (IHQ); porém, seu uso ainda não foi transferido à prática clínica. Alguns demonstraram significância estatística como marcadores prognósticos no campo da pesquisa; porém, até o presente, não há análise sistemática para justificar ou sugerir aqueles capazes de redefinir o estadiamento da doença e prever o prognóstico na prática clínica (Gould e cols., 2010; Rey e cols., 2010; Moore e cols., 2012; Cheng e cols., 2012).

1.3.1 Kindlin-1

Fermitin family member 1 (FERMT1, Kindlin-1) é um regulador específico da integrina, pertencendo a uma família de proteínas de adesão e está associado com diversas patologias genéticas, incluindo a Síndrome de Kindler, uma desordem genética caracterizada por aparecimento de bolhas na pele, atrofia e fotossensibilidade. Existem 3 tipos de kindlins em mamíferos, sendo a expressão do kindlin-1 primariamente em células epiteliais. Estudos *in vitro*, *in vivo* em ratos e em pacientes com deficiências genéticas em kindlins demonstraram que eles regulam a capacidade das integrinas de mediar suas funções. Além de mediar a adesão e a via integrina pela ativação de várias classes $\beta 1$ de integrinas (compartilhadas por todos kindlins), kindlin-1 se liga e ativa a integrina $\alpha \nu \beta 6$ (não compartilhada pelo kindlin-2). A figura 1 (pg. 15) mostra o ciclo de funcionamento dos kindlins (Siegel e cols., 2003; White e cols., 2005; Landemaine e cols., 2008).

O termo *integrina* foi criado, há mais de três décadas, para designar receptores de células de adesão. Estudos clínicos têm emergido com o objetivo de verificar o papel de drogas com alvo em integrinas para o tratamento de

esclerose múltipla, trombose e câncer, assim como a implicação de kindlins no campo das integrinas, hoje aceitos como reguladores da função destas. Células deficientes de Kindlin-1 exibem defeitos na ativação da B1 integrina, sendo prejudicadas na adesão celular, proliferação, polaridade e mobilidade. A maioria dos estudos sobre a relevância deste marcador foca em doenças de pele. O provável papel deste marcador no câncer permanece desconhecido. (Malinin e cols., 2010; Shattil e cols, 2010; Ye e cols., 2011).

1.3.2 Kindlin-1 e Câncer

Weinstein e cols. (2003) demonstraram que uma das primeiras evidências das implicações do kindlin-1 em câncer veio das mensurações da seu nível de expressão de mRNA. Estes níveis estavam elevados em 60% dos cânceres de pulmão e em 70% dos cânceres de cólon.

Mahawithitwong e cols. (2013) referiram que kindlin-1 também expressou-se em câncer pancreático, em estudo de IHQ, sendo encontrado no citoplasma e membrana de células cancerígenas deste órgão, enquanto células epiteliais ductais normais não o expressaram.

Também foi demonstrado seu papel em pior prognóstico em câncer de pulmão e mama e sua relação com um maior número de metástases pulmonares provenientes de tumores de vários órgãos. Em estudos prévios sobre marcadores de metástases, foi identificado Kindlin-1 como sendo preditor de metástases pulmonares no câncer de mama, independente do subtipo molecular (Driouch e cols., 2009; Sin e cols., 2011).

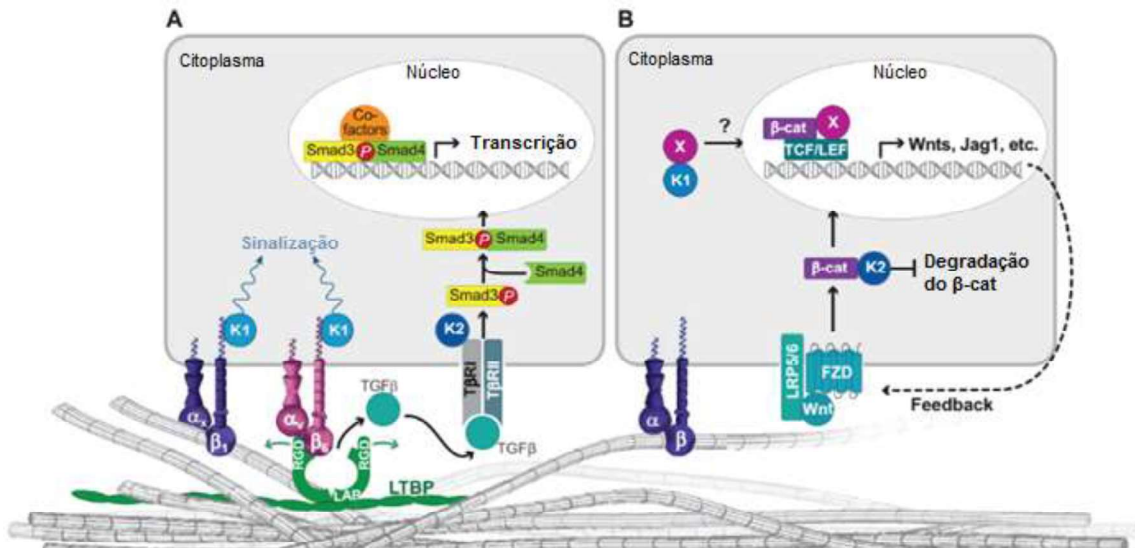


FIGURA 1 (referida no texto na pg. 13). Kindlins regulam as vias Wnt e TGF β . (A) Via Kindlins e TGF β : a integrina $\alpha\beta$ 6 se liga ao tripeptídeo Arg-Gly-Asp (RGD) do peptídeo associado à latência (LAP), que é associado com a proteína de ligação a TGF β latente (LTBP) e induz à liberação de TGF β . TGF β livres ligam-se aos receptores beta do fator de crescimento transformador I e II (T β RI e T β RII), que desencadeia fosforilação do Smad3, associação com Smad4 e a transcrição dos genes alvo TGF β . (B) Via Kindlins e Wnt. Kindlins-1 suprimem a via Wnt no citoplasma independente da integrina, potencialmente, por reter os cofatores transcripcionais no citoplasma. A perda do Kindlin-1 leva à transcrição do ligante Wnt. Kindlin-2 liga-se a β -catenin, que inibe sua degradação (fonte: Rognoni e cols., 2016).

1.3.3 Ki-67

A proteína Ki-67 foi originalmente definida com o protótipo monoclonal Ki-67, que foi reconhecido em 1983 como um antígeno nuclear associado com a proliferação celular. O antígeno Ki-67 foi obtido em estudo que objetivavam a produção de anticorpos monoclonais de antígenos nucleares específicos para células do câncer tipo Hodgkin. Após essa descoberta, mudou-se a forma de analisar a proliferação celular: se antes era necessário injetar precursores de DNA radioativos antes da biópsia, hoje não é mais. Com a injeção de radioativos, a taxa de proliferação era então estimada a partir da mensuração da captação de radioatividade pelo núcleo da célula tumoral. Essa técnica, além de tudo, era eticamente questionada em função do desconhecimento acerca do efeito da internalização nuclear de radioatividade no DNA humano. Dado que o Ki-67 não reage com células em estado de repouso, é razoável inferir que o antígeno nuclear Ki-67 não é expresso durante a fase G0 do ciclo celular. Logo, esse antígeno é uma ferramenta importante para a determinação, de forma confiável e rápida, da taxa de proliferação celular de tumores malignos (Gerdes e cols., 1983).

1.3.4 Ki-67 e lesões melanocíticas

O papel do antígeno Ki-67 no câncer de pele ainda tem sido estudado. Estudos apontam para a possibilidade de usá-lo frente ao diagnóstico diferencial de lesões melanocíticas, mais especificamente entre nevo e melanoma, visto que os métodos atuais não são sensíveis nem específicos o suficiente para uma adequada diferenciação. Resultados de estudos independentes baseados em análise por IHQ são discordantes em relação ao papel deste marcador na doença (Schramm e cols., 2011).

O exame histopatológico permanece como de escolha para o diagnóstico de tumores pigmentados suspeitos: um nevo e um melanoma diferem na ausência ou presença de aberrações cromossômicas, respectivamente. Contudo, essa distinção histopatológica pode ser, em alguns casos, difícil, havendo sobretudo diferenças no diagnóstico de patologistas entre nevo e melanoma que varia entre 2,3% a 25% dos tumores. A IHQ é rotineiramente usada na maioria dos centros de patologia para confirmação de diagnóstico. Um recente estudo demonstrou que o índice de proliferação Ki-67 foi maior em tumores melanocíticos malignos do que em nevos, e maior em metástases do que em melanomas primários. Apesar desses resultados, um baixo índice Ki-67 para lesões malignas não elimina a possibilidade de melanoma, ou seja, o índice Ki-67 para diferenciar entre nevo e lesão melanocítica maligna permanece incompleto por causa de alguns tumores malignos de baixa proliferação. Isso demonstra que ainda são necessários estudos adicionais para esse campo (Unguen e cols., 2015).

Muitos estudos têm mostrado uma associação entre índice mitótico e melanoma fino (espessura de até 1mm) a fim de prever prognóstico. Uma

ferramenta mais específica, dentro da cinética celular, que tem sido estudada como marcador de prognóstico, é o índice Ki-67. Alguns estudos divergem quanto ao uso do marcador Ki-67 ou de fatores de prognóstico convencionais (sexo, localização, nível de invasão, espessura do tumor, ulceração, contagem mitótica, índice de prognóstico e estágio clínico) para prever prognóstico do paciente. Há indicações de que o índice de proliferação celular Ki-67 não apresente informação prognóstica adicional para melanoma maligno cutâneo localizado (Henrique e cols., 2000; Vereecken e cols., 2007).

Wandler e cols. (2016) buscaram investigar se o índice Ki-67 poderia prevenir diagnósticos falso-negativo em melanomas. Foi proposto que, apesar do critério convencional para malignidade ser avaliado em termos iguais, em casos mais difíceis a alta proliferação celular poderia ser sugestiva de melanoma. Porém, essa abordagem seria limitada, pois o potencial proliferativo é, de fato, limitado em alguns melanomas. Em suma, o índice de proliferação celular Ki-67 pode ajudar na prevenção de erro no diagnóstico da maioria dos melanomas que, inicialmente, são classificados como nevos benignos ou displásicos.

Nielsen e cols. (2013) compararam o impacto do prognóstico, por IHC, dos marcadores fosfo-histona H3/MART1 e Ki67/MART1, combinados, com a coloração por hematoxilina-eosina (HE) em MCP. Seus resultados mostraram uma superioridade dos marcadores em relação ao índice de proliferação visualizado pela coloração da HE para predizer prognóstico nos estágios I e II da doença.

1.4 Referências

American Cancer Society. Cancer facts and figures. ACS, Atlanta; 2016. [acesso em 2016 nov 28]. Disponível em: www.cancer.org.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009;27: 6199–6206.

Breslow A (1970) Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*, 172: 902–908.

Cheng Y, Lu J, Chen G, et al. Stage-specific prognostic biomarkers in melanoma. *Oncotarget*. 2015;6(6):4180-4189.

Chin L, Merlino G, Depinho RA. Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. *Genes Dev*. 1998;12:3467–3481.

Clark WH, Elder DE, Guerry D. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst*. 1989;81:1893–1904.

Clark WH. Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 1991;10:83–88.

Driouch k, Bonin F, Sin S. Confounding effects in “a six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis”: reply. *Cancer Res*. 2009;69(24):9507-9511.

Elder D. Tumor progression, early diagnosis and prognosis of melanoma. *Acta Oncol*. 1999;38(5):535–547.

Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin*. 1985;35(3):130–151.

Gallagher WM, Bergin OE, Rafferty M, Kelly ZD, Nolan IM, Fox EJ. Multiple markers for melanoma progression regulated by DNA methylation: insights from transcriptomic studies. *Carcinogenesis*. 2005;26(11):1856–1867.

Geller AC, Swetter SM, Brooks K. Screening, early detection, and trends for melanoma: current status (2000–2006) and future directions. *J Am Acad Dermatol*. 2007;57(4):555–572.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer Oncol*. 1983;31:13-20.

Gimotty PA, Botbyl J, Soong SJ. A population-based validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*. 2005;23: 8065–75.

Grazziotin TC, Rey MC, Bica CG, et al. Genetic variations of patients with familial or multiple melanoma in Southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013;27:179–185.

Gober MD, Bashir HM, Seykora JT. Reconstructing skin cancers using animal models. *Cancer metastasis reviews*. 2013;32(0):123-128.

Gould Rothberg BE, Rimm DL. Biomarkers: the useful and the not so useful—an assessment of molecular prognostic markers for cutaneous melanoma. *The Journal of investigative dermatology*. 2010; 130:1971–1987.

Grande SH, Reinke K, Shaikh L, Leong SP, Miller JR. Prognostic significance of extent of ulceration in primary cutaneous melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2006;30: 1396–1400.

Haass NK, Herlyn M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2005;10:153–63.

Henrique R, Azevedo R, Bento MJ, Domingues JC, Silva C, Jeronimo C. Prognostic value of Ki-67 expression in localized cutaneous malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2000;43:991-1000.

Herman C. Emerging technologies for the detection of melanoma: achieving better outcomes. *Dove press*. 2012;5:195–212.

Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1996;1:188–194.

Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17:548–558.

Instituto Nacional do Câncer. Tipos de câncer. INCA, Rio de Janeiro; 2016. [acesso em 2016 nov 28]. Disponível em: www.inca.gov.br.

Li J, Cheng Y, Tai D. Prognostic significance of BRMS1 expression in human melanoma and its role in tumor angiogenesis. *Oncogene*. 2011; 30(8): 896-906.

Jemal A, Siegel R, Ward E. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008; 58: 71–96.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010; 60: 277–300.

Kreiseder B, Orel L, Bujnow C. α -Catulin ownregulates E-cadherin and promotes melanoma progression and invasion. *Int. J. Câncer*. 2012; 132: 521–530.

La Porta CA. Drug resistance in melanoma: new perspectives. *Curr Med Chem*. 2007;14, 387–91.

Landemaine T, Jackson A, Bellahcene A. A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis. *Cancer Res*. 2008;68(15):6092-6099.

Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol*. 2004;150:179–185.

Mahawithitwong P, Ohuchida K, Ikenaga N, Fujita H, Zhao M, Kozono S. Kindlin-1 expression is involved in migration and invasion of pancreatic cancer. *Int.J.Oncol*. 2013 Apr;42(4):1360–6.

Malinin NL, Plow EF, Byzova TV. Kindlins in FERM adhesion. *Blood*. 2010; 115:4011–7.

Meyer S, Fuchs TJ, Bosserhoff AK. A seven-marker signature and clinical outcome in malignant melanoma: a large-scale tissue-microarray study with two independent patient cohorts. *Plos one*. 2012;7(6):1-14.

Moore DA, Pringle JH, Saldanha GS. Prognostic tissue markers in melanoma. *Histopathology*. 2012; 60: 679–689.

Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med*. 2006; 355:1307–1317.

Nielsen PS, Riber-Hansen R, Jensen TO, Schmidt H, Steiniche T. Proliferation indices of phosphohistone H3 and Ki67: strong prognostic markers in a consecutive cohort with stage I/II melanoma. *Mod Pathol*. 2013; 26: 404–13.

Poser I, Domínguez D, de Herreros AG. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem*. 2001;276:24661–24666.

Qin Y, Deng W, Ekmekcioglu S, Grimm EA. Identification of unique sensitizing targets for anti-inflammatory CDDO-Me in metastatic melanoma by a large-scale synthetic lethal RNAi screening. *Pigment cell & melanoma research*. 2013; 26(1):97-112.

Rass K, Hassel JC. Chemotherapeutics, chemoresistance and the management of melanoma. *G Ital Dermatol Venereol*. 2009; 144: 61–78.

Rey, MCW; Bonamigo, RR; Cartell, A; Furian, R; Bonfá, R; Bonfá, R. MMP-2 and TIMP-2 in Cutaneous Melanoma: Association With Prognostic Factors and Description in Cutaneous Metastases. *Am J Dermatopathol*. 2010; letter to the editor.

Rognoni E, Ruppert R, Fassler R. The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease. *J Cell Sci.* 2016;129(1):17–27.

Schramm SJ, Mann GJ. Melanoma Prognosis: A REMARK-Based Systematic Review and Bioinformatic Analysis of Immunohistochemical and Gene Microarray Studies. *Mol Cancer Ther.* 2011; 10: 1520-28.

Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2010 Apr; 11(4):288–300.

Siegel DH, Ashton GH, Penagos HG, Lee JV, Feiler HS, Wilhelmsen KC. Loss of kindlin-1, a human homolog of the *Caenorhabditis elegans* actinextracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome. *Am..J..Hum..Genet.* 2003; 73(1):174–87.

Sin S, Bonin F, Petit V, Meseure D, Lallemand F, Bieche I, et al. Role of the focal adhesion protein kindlin-1 in breast cancer growth and lung metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 2011 Sep; 103(17):1323–37.

Sin S, Bonin F, Petit V. Role of the Focal Adhesion Protein Kindlin-1 in Breast Cancer Growth and Lung Metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103:1-15.

Sondak VK, Ross MI, Schuchter LM. Early stage (I, II, III) melanoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2001;2:183–191.

Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in cancer onset and progression. *Bull Acad NatlMed.* 2009;193:1969–1978.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:442–454.

Uguen A, Talagas M, Costa S, Duigou S, Bouvier S, De Braekeleer M, et al. A p16-Ki-67-HMB45 immunohistochemistry scoring system as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Diagn Pathol.* 2015;10:195–9.

Vereecken, P., Laporte, M. and Heenen, M. Significance of cell kinetic parameters in the prognosis of malignant melanoma: a review. *Journal of Cutaneous Pathology.* 2007; 34: 139–145.

Wandler A, Spaun E, Steiniche T, Nielsen PS. Automated quantification of Ki67/MART1 stains may prevent false-negative melanoma diagnoses. *J Cutan Pathol.* 2016;43:956-962.

Weinstein EJ, Bourner M, Head R, Zakeri H, Bauer C, Mazzarella R. URP1: a member of a novel family of PH and FERM domain-containing membrane-associated proteins is significantly overexpressed in lung and colon carcinomas. *Biochim.Biophys.Acta.* 2003 Apr;1637(3):207–16.

White SJ, McLean WH. Kindler surprise: mutations in a novel actin-associated protein cause Kindler syndrome. *J.Dermatol.Sci.* 2005 Jun;38(3):169–75.

Wisco OJ, Sober AJ. Prognostic Factors for melanoma. *Dermatol Clin.* 2012; 30:469-485.

Ye F, Petrich BG. Kindlin: helper, co-activator, or booster of talin in integrin activation? *Curr. Opin. Hematol.* 2011 Sep;18(5):356–60.

2. Objetivos

Os objetivos deste estudo foram:

2.1 Geral: avaliar a expressão dos marcadores Kindlin-1 e Ki-67 em melanomas primários, por IHQ;

2.2 Específico: relacionar a expressão destes marcadores ao estadiamento clínico da doença, aos parâmetros clínico-patológicos como espessura do tumor, ulceração, taxa mitótica e acometimento linfonodal e aos fatores de risco como fototipo de pele, cor dos olhos e queimadura solar prévia na infância.

3. Artigo científico redigido em inglês

Evaluation of Kindlin-1 and Ki-67 markers in prognostic factors of primary cutaneous malignant melanoma

AUTHORS

Luciana El Halal Schuch¹, Munique Mendonça Azevedo¹, Roque Furian²,
Péttala Rigon¹, Keli Reiter¹, Felice Riccardi², Claudia Giuliano Bica^{1*}

AFFILIATIONS

¹ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil

² Hospital Santa Rita, Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

* Corresponding author: CG Bica, 245 Sarmento Leite Street, Porto Alegre/RS, Brazil. Zip Code: 90050170. Phone: +55(51) 3303-8794, e-mail: claudia@ufcspa.edu.br

Abstract

Background: As one of the most metastatic potential, cutaneous melanoma has its current prognostic prediction proposed by American Joint Committee on Cancer (AJCC). Even though many studies have already been done in this sense, tumours with similar clinical and pathological presentations may have different behaviours. The aim of this study was to correlate, through immunohistochemistry, Ki-67 and Kindlin-1 staining in malignant melanomas with its prognostic factors. **Methods:** Immunohistochemistry, using mouse anti-human Kindlin-1 and Ki-67 monoclonal antibodies, was performed on the cell-block of primary cutaneous melanoma of 30 patients treated between 2006 and 2014 at our institution. Information regarding pathological data and outcomes were retrieved from medical records. Statistical analyses were conducted in SPSS version 23.0. **Results:** The expression of Ki-67 was detected in all patients with primary cutaneous melanoma, while Kindlin was negative in 2 patients. Kindlin-1 expression was not significantly correlated with Ki-67 expression by Spearman's rank correlation analysis ($P = 0,46$), as well as the expression of both markers and the clinical stage ($P = 0,34$ and $0,18$, respectively). Breslow, Clark and mitotic rate were significantly correlated with AJCC stage ($P = 0,001$). **Conclusion:** Additional studies are needed to confront our findings, due to conflicting results on the subject.

Keywords: *cutaneous melanoma, prognostic tumor markers, immunohistochemistry, Ki-67, Kindlin-1*

Introduction

Cutaneous melanoma is a tumor originating from normal skin melanocytes, and its incidence in individuals of European origin continues to rise worldwide. In the United States, approximately 76.380 new diagnosed cases during the year 2016 are estimated (1). Among the Brazilian population are estimated 3,03 new cases of the disease in 100.000 habitants for man and 2,59 for woman. The three southernmost states of Brazil have the highest proportion of individuals with North European white-skin ancestry and the highest CM indexes of the country, with estimated 6,96 new cases in 100.000 habitants for man and 6,5 for women, in 2016 (2,3). It is one of the most aggressive malignant neoplasms and its clinical course is often unpredictable. Melanoma has a high metastatic potential, and metastatic melanoma is difficult to treat, albeit the therapeutic management of metastatic melanoma is now being improved by targeted therapies (4).

The staging system proposed by American Joint Committee on Cancer (AJCC) is currently used for melanoma classification, prognostic prediction and management of patients (5). Tumor invasion (Breslow thickness) has become the gold standard for stratifying patients according to the risk of metastatic disease. However, these studies also point out that, in some cases, tumor thickness has not been as accurate an indicator of biologic behavior (6). It is recognized that early-stage melanomas are clinically heterogeneous with a subset exhibiting high-risk behaviors; approximate 5% of Stage I melanomas metastasize early and eventually cause death (7). Surgical excision of localized cutaneous melanoma (AJCC stages I and II - approximately 75% of diagnoses) may lead to cure in many patients. The overall 5-year survival rate for these

patients (AJCC stages I and II) is approximately 80%, suggesting that approximately 20% of stage I and II patients may have micro metastatic disease at the time of diagnosis (8).

Thus, identifying biomarkers in conjunction with traditional cancer staging and prognosis could improve early diagnosis and patient care. Despite the efforts that have been made, reliable biomarkers are still lacking. Therefore, there is an urgent need to better understand the regulating factors contributing to melanoma initiation, progression, and metastases (9).

More prognostic factors are needed to improve the prediction on high-risk patients. Many researches have shown an association between mitotic index and thin melanoma in order to predict the prognosis (10). Ki-67 index has been studied as prognostic marker. However, the prognostic value of proliferative activity in cutaneous malignant melanoma is still a conflicting issue. There are divergent findings between some studies about the use of Ki-67 index or conventional prognostic factors (sex, location, level of invasion, tumor thickness, ulceration, mitotic count, prognostic index and clinical stage). There are indications that Ki-67 index does not carry additional prognostic information for localized cutaneous malignant melanoma (11).

Biomarkers that are able to provide additional information about disease progression, identified by immunohistochemistry, have been extensively evaluated (12). But unfortunately, none have been translated into clinical practice. Some of these biomarkers have demonstrated statistical significance as a prognostic marker in a research setting; however, at present, there has been no systematic analysis of molecular biomarkers to identify those capable of refining sub groupings for individual AJCC stages (13,14).

Kindlin-1

Among biomarkers, kindlins are being studied in cancer for more than a decade. Fermitin family member 1 (FERMT1, Kindlin-1) is an epithelial-specific regulator of integrin functions and is associated with Kindler syndrome, a genetic disorder characterized by skin blistering, atrophy, and photosensitivity. However, the possible role of kindlin-1 in cancer remains unknown (15).

The most studied function of kindlins revolves around their role in integrin activation. The term *integrines* was coined more than three decades ago to designate a family of cell-surface adhesion receptor. The interrelationship between integrins and cancer pathology has inevitably led to consideration of the role of kindlins in cancer. Within the last five years, more than 70 publications have linked kindlins, integrins and cancer (16). Kindlin-1 deficient cells exhibit defects in B1 integrin activation and impaired cell adhesion, proliferation, polarity, and motility. Most kindlin-related studies focus on kindlin relevance in skin disease. Also, it was reported a role in a poor prognosis in both breast and lung adenocarcinoma, and most studies documented aberrant kindlin-1 expression levels in cancers of epithelial origin to be consistent with its primary epithelial localization. In patients lacking kindlin-1 (Kindler Syndrome patients), there is a suggestion of an increased risk of squamous cell carcinomas (17).

Measurements of kindlins mRNA expression levels were elevated in 60% of lung and 70% of breast cancer; it was also found to be associated with the pathology of glioma and pancreatic cancer (18,19).

Although there are researches demonstrating the role of Kindlin antibody in the prognosis of other cancers, there is no study of this marker in primary melanoma to the best of our knowledge.

Ki-67

The Ki-67 protein was originally defined as a Ki-67 monoclonal prototype that was recognized in 1983 as an antigen nuclear associated with cell proliferation. The Ki-67 antigen was obtained in a study aimed to production of specific nuclear antigens monoclonal antibodies for Hodgkin cancer cells. This antigen is an important tool for determinate, reliably and quickly, cell proliferation rate of malignant tumors (20).

Researches indicate for a possibility to use Ki-67 antigen in front of the different diagnoses of melanocytic lesions, more specifically between nevus and melanoma, assumed the actual methods are not sensitive or specific enough for proper differentiation. Immunohistochemistry is routinely used in the majority of pathology centers. A study proposed the triple score-based immunostaining considering p16, Ki-67 and HMB45 to differentiate nevus and melanoma. The proliferation index Ki-67 was higher in malignant melanocytic tumors than in nevi and larger in metastasis than in primary melanomas. Despite these results, a low index of Ki-67 for malignant lesions does not eliminate the possibility of melanoma, due to some low proliferation of malignant tumors. This demonstrates that further studies are still needed for this field (21,22).

A study sought to investigate if the Ki-67 index could prevent false-negative diagnoses in melanomas. It was proposed that, despite the conventional wisdom for malignancy being evaluated on equal terms, in more difficult cases, high cellular proliferation could be suggestive of melanoma and

the cell proliferation index Ki-67 could help prevent error in the diagnosis of most melanomas that, initially, were classified as benign or dysplastic (23).

Another study found alternatives to conventional mitotic detection by hematoxylin and eosin in stage I/II melanomas in general, comparing the prognostic impact of phosphohistone H3/MART1, Ki67/MART1, and hematoxylin and eosin stains in primary cutaneous melanoma (24).

The aim of this study was to correlate, through immunohistochemistry, Ki-67 and Kindlin-1 staining in primary malignant melanomas with its prognostic factors.

Materials and Methods

Patients and tissue samples

We retrieved thirty patients from the files diagnosed and treated in our institution (Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre Hospital – ISCMPA, and Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA), between July 2006 and September 2014, completing at least two years of follow up. Clinical records were reviewed, and follow-up data was obtained from these records and from tumor registry records. The subjects were questioned about the main risk factors of this neoplasia: sunburn episodes, familiar and personal melanoma history, phenotypic characteristics and skin's phototype.

Written informed consent was obtained from each patient according to the recommendations of the local ethics committee. This study was approved by the ethics committee of the hospital and the university where the study was developed (ISCMPA and UFCSPA, respectively).

From each patient, formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissue (which

were identified on hematoxylin and eosin-stained sections) was picked up from the pathology laboratory from ISCOMPA. When necessary, adjacent sections stained immunohistochemically for melanoma - associated antigens, including S100 protein, melan A and HMB-45, were made. Independent histopathological review was performed by two pathologists on separate occasions.

Immunohistochemistry

The most representative tumor area on the hematoxylin/eosin-stained slides was selected. Tissue sections 4µm thick were placed on silanized slides and dried at 60°C for 30 min. Then, the slides were deparaffinized by three washes in xylene (5 min each) and rehydrated by successive washes in ethanol (absolute, 95%, 70% and 50%) and distilled water, according laboratory protocol. The antigen retrieval was performed at 98°C for 40min in pH 9.0 TRIS-EDTA buffer. After heating and cooling for 20min, endogenous peroxidase activity was blocked by immersing the slides in hydrogen peroxide 5% in methanol (3x 10min). Finally, the slides were washed twice with 1X phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and incubated in 1% BSA (bovine serum albumin) solution to block non-specific protein binding.

Primary antibodies Ki-67 (1:50, mouse anti-human monoclonal Mib-1 - Dako^R, California, USA) and Kindlin-1 (1:100, mouse anti-human monoclonal antibody - Millipore^R, Massachusetts, USA) were incubated for 1h at room temperature and then submitted to 4°C, overnight. Colon and breast cancer were used as positive controls, respectively. The negative controls were the same tissues but without incubation with primary antibody. After washing with PBS, the slides were then incubated with peroxidase-labeled polymer PictureTM

Max HRP polymer conjugate broad spectrum (Life Technologies^R, California, USA) and further with DAB substrate-chromogen (Dako^R, California, USA).

The quality (number, intensity and pattern) of every staining procedure for Kindlin-1 and Ki-67 has been comparatively evaluated using consecutive control sections, and the staining intensity was scored in a blinded manner by two independent pathologists. Their signals concentrated primarily within the cytoplasm (Kindlin) and nucleus (Ki-67) of the tumor cells. The scores of the two pathologists were compared, and any discrepant scores were re-examined to achieve a consensus score. Kindlin-1 staining intensity was scored as negative, focal, multifocal and diffuse. The percentage of Ki-67-positive cells was scored as percentage 0-25%, 26-50%, 51-75% and 76-100%, to illustrate, and measured in a continual analysis, from 0 % to 100%.

Statistical analysis

The software of SPSS version 23.0 for Windows (SPSS Inc., IL, USA) was used for statistical analysis. We used the Mann-Whitney test to associate Kindlin-1 and Ki-67 expression and the clinicopathological parameters of the melanoma patients, including risk factors, AJCC stage, tumor thickness, ulceration, histological subtype and tumor location. Correlation between Kindlin-1 and Ki-67 expression was analyzed using Spearman's rank correlation analysis. A Cox regression model was used for multivariate analysis. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

The patients included in the study were caucasians and the median age

was $50,93 \pm 15,31$ years old. Among the patients, 46,7% (14/30) were men and 53,3% (16/30) were women. The characteristics referring to the primary tumor are shown in table 1.

The expression of Ki-67 was detected in all patients (100%) with primary cutaneous melanoma, while Kindlin-1 was negative in 2 patients. The correlation of Kindlin-1 and Ki-67 expression and AJCC stages in all patients was assessed. The immunohistochemistry results are illustrated in graphics 1 and 2.

The correlation of Kindlin-1 and Ki-67 expression with the clinicopathological features of patients with primary melanoma is summarized in Table 2. Among clinical risk factors, Kindlin-1 and Ki-67 expression did not correlate with skin phototype, eye color or previous childhood sunburn episodes ($P = 0,51$ and $0,93$; $P = 0,49$ and $0,68$; $P = 0,83$ and $0,07$, respectively). Among pathological factors, markers expression was not significantly associated with presence of ulceration, sentinel lymph node status, Breslow thickness and mitosis rate ($P = 0,66$ and $0,51$; $P = 0,31$ and $0,37$; $P = 0,57$ and $0,37$; $P = 0,37$ and $0,72$, respectively).

Clinicopathological characteristics, including Breslow, Clark and mitotic rates, was correlated with AJCC stage, as the results of immunohistochemistry for Kindlin-1 and Ki-67 (table 3). Breslow, Clark and mitotic rate were significantly correlated with AJCC stage ($P = 0,001$). Kindlin-1 expression was not significantly correlated with Ki-67 expression by Spearman's rank correlation analysis ($P = 0,46$), as well as the expression of both markers and the clinical stage ($P = 0,34$ and $0,18$, respectively).

Discussion

The primary objective of this study was to evaluate Kindlin-1 and Ki-67 immunostaining in a series of primary melanoma. Malignant melanoma is an aggressive skin cancer due to its rapid progression, propensity to metastasize, poor prognosis and intrinsic resistance to treatment. Due to the disease heterogeneity, tumors markers are needed to stratify melanoma patients and estimating probability of disease progression and survival. There is little knowledge about prognostic markers in primary melanoma, as there are few studies that correlate these markers in primary melanoma with clinicopathological characteristics of this disease. We know that some researches about tumors markers have compared dysplastic nevi, primary melanoma and melanoma metastasis, correlating with disease progression.

Studies of tumor biomarkers are valuable as they assist in disease stratification and improve our understandings of tumor progression. However, the most valuable biomarkers are those that reliably indicate response to treatment (12).

A study has shown that Kindlin-1 expression in breast tumors is associated with lung metastasis and free survival (13). There is some evidence that Kindlin-1 is potentially a clinically relevant mediator of lung metastasis in breast cancer and possibly other carcinomas metastasizing to the lung such as colon cancer, for which overexpression of Kindlin-1 was previously reported in a small cohort of 7 patients (14).

Ki-67 index was reported to be higher in malignant melanomas than in benign nevi. Its expression has also been correlated to prognosis in patients with melanomas (18,19,20).

There is a great heterogeneity in the IHC analysis strategy regarding techniques, count methods (manual or automatic, single or double staining, number of tumor cells nuclei analyzed, mean value calculated in the whole lesion or only in the most proliferative hotspots) and number of tissue samples tested. Our study showed that there is no correlation between the tested markers and risk factors or clinical-pathological parameters, refuting some previous results in case of correlating Ki-67 in cutaneous melanoma and prognostic factors. We did not establish a cut-off point to measure Ki-67 staining in tissue samples like others studies did; we used a continuous value of percentage to correlate it with clinical parameters, as there is no pattern of measuring intensity established in primary melanoma of this marker in literature.

The authors did not find any study in literature about Kindlin staining in primary melanomas, but there are few others correlating Kindlin and prognosis of other cancers. Our results did not show correlation between this marker and clinical-pathological parameters.

Our study did not compare primary melanoma samples and metastatic disease or dysplastic nevus, as it has been seen in some studies (8,12,13). We believe that this comparison may show differences between markers expression in each condition. Beyond this limitation, a larger cohort could demonstrate different results.

We believe that additional studies are also necessary to confront our score to clinical evolution to explore its potential prognostic significance.

Conflict of interest statement

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgments

We thank the Laboratory of Pathology and Research Support Department (Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil). This study was funded by the following research grants and fellowships: CNPq and CAPES.

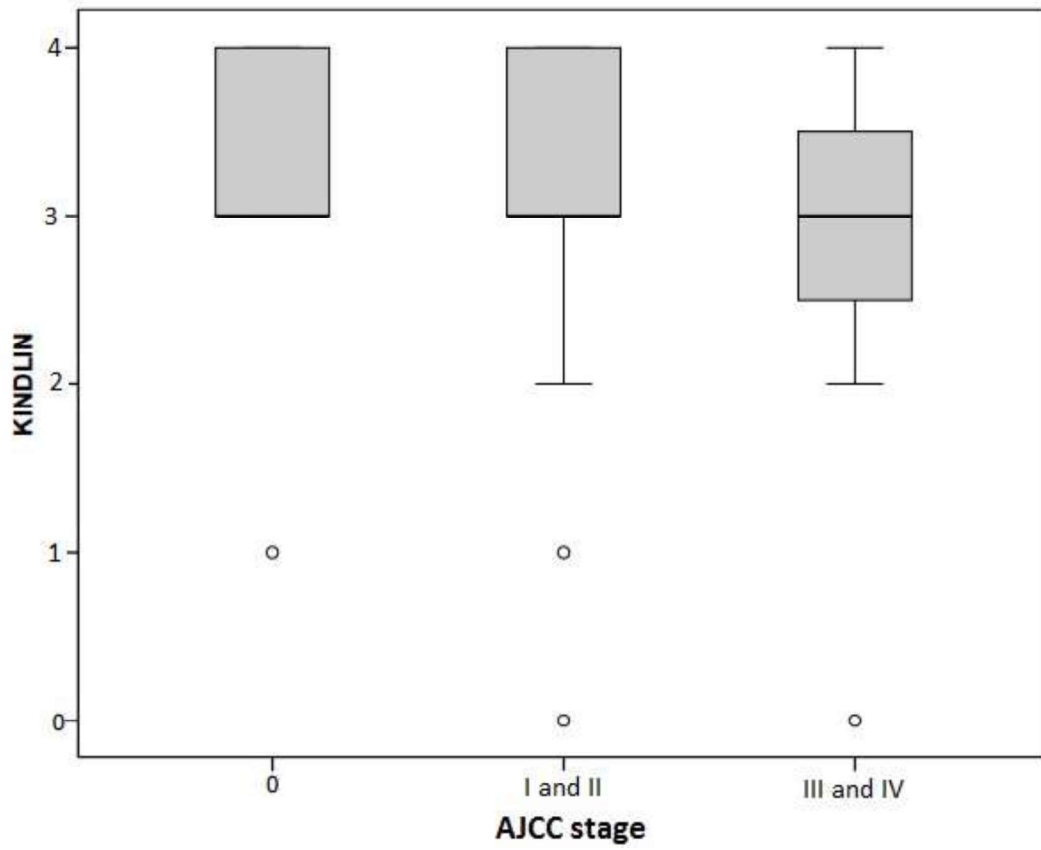
References

1. American Cancer Society. Cancer facts and figures. ACS, Atlanta; 2016. [accessed in 2016 nov 28]. Available from: www.cancer.org.
2. Grazziotin TC, Rey MC, Bica CG, et al. Genetic variations of patients with familial or multiple melanoma in Southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013;27:179–185.
3. Instituto Nacional do Câncer. Tipos de Câncer. INCA, Rio de Janeiro; 2016. [accessed in 2016 nov 28]. Available from: www.inca.gov.br.
4. Reid AL, Millward M, Pearce R, et al. Markers of circulating tumour cells in the peripheral blood of patients with melanoma correlate with disease recurrence and progression. *Br J Dermatol*. 2013;168(1):85–92.
5. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S, et al. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(36):6199-6206.
6. Ning Li, Janine Mangini and Li N, Mangini J, Bhawan J. New prognostic factors of cutaneous Jag Bhawan melanoma: a review of the literature. *Dermatopathology Section, Department of J Cutan Pathol*. 2002;29: 324–340.
7. Gimotty PA, Botbyl J, Soong SJ, Guerry D. A population based validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*. 2005;23:8065–8075.
8. Chen T. & Zhu J. Evaluation of EMMPRIN and MMP-2 in the prognosis of primary cutaneous malignant melanoma. *Med Oncol*. 2010;27, 1185–1191.
9. Chen G, Cheng Y, Zhang Z, Martinka M and Li G: Prognostic significance of cytoplasmic p27 expression in human melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20:2212–2221.
10. Vereecken, P., Laporte, M. and Heenen, M. Significance of cell kinetic parameters in the prognosis of malignant melanoma: a review. *Journal of Cutaneous Pathology*. 2007;34:139–145.
11. Henrique R, Azevedo R, Bento MJ, Domingues JC, Silva C, Jeronimo C. Prognostic value of Ki-67 expression in localized cutaneous

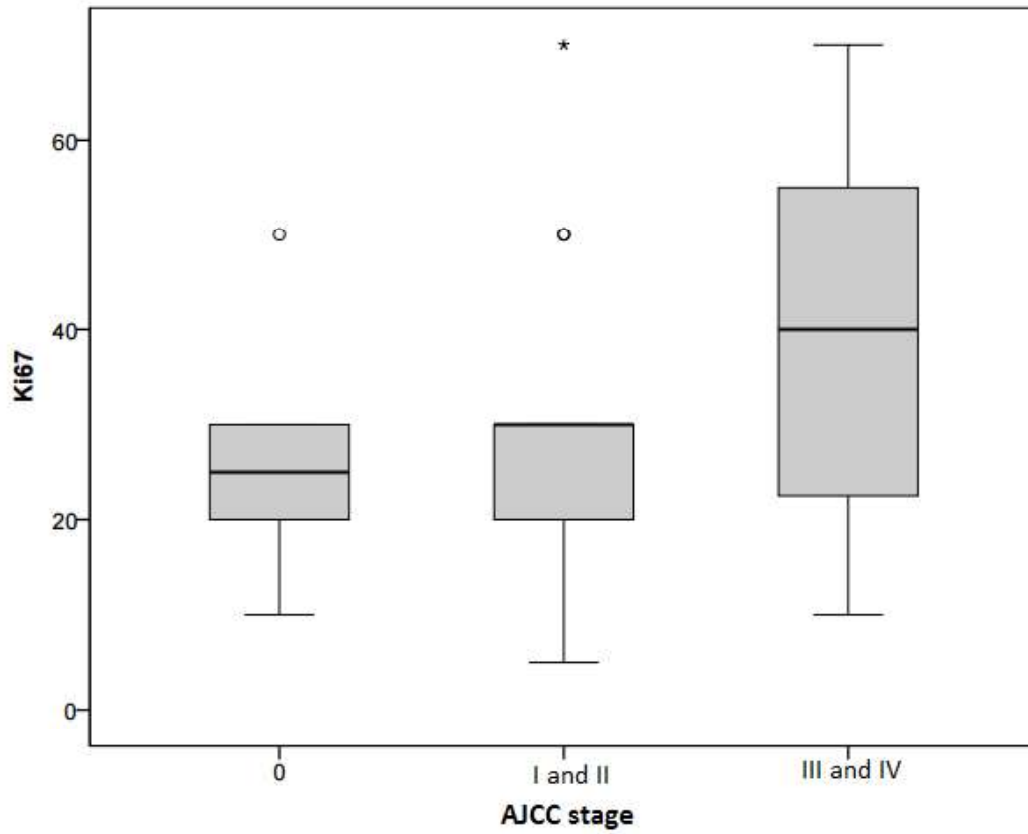
malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2000; 43:991-1000.

12. Gould Rothberg BE, Bracken MB, Rimm DL. Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:452–74.
13. Cheng Y, Lu J, Chen G, et al. Stage-specific prognostic biomarkers in melanoma. *Oncotarget.* 2015; 6:4180–4189
14. Steven J. Ohsie, G. Peter Sarantopoulos, Alistair J. Cochran and Scott W. Binder Immunohistochemical characteristics of melanoma *J Cutan Pathol.* 2008;35:433–444
15. Landemaine T, Jackson A, Bellahcene A, et al. A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis. *Cancer Res.* 2008; 68:6092–6099.10.
16. Plow EF, Das M, Bialkowska K, Sossey-Alaoui K. Of Kindlins and Cancer. *Discoveries.* 2016;4(2):59.
17. Sin S, Bonin F, Petit V, et al. Role of the focal adhesion protein kindlin-1 in breast cancer growth and lung metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103:1323–1337.
18. Weinstein EJ, Bourner M, Head R, Zakeri H, Bauer C, Mazarella R. URP1: a member of a novel family of PH and FERM domain-containing membrane-associated proteins is significantly over-expressed in lung and colon carcinomas. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1637(3):207–16
19. Mahawithitwong P, Ohuchida K, Ikenaga N, et al. Kindlin-1 expression is involved in migration and invasion of pancreatic cancer. *International Journal of Oncology.* 2013;42,1360-1366.
20. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International journal of cancer.* 1983;31(1):13–20.
21. Uguen A, Talagas M, Costa S, et al. A p16-Ki-67-HMB45 immunohistochemistry scoring system as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Diagn Pathol.* 2015; 10:195–9.
22. Prieto VG, Shea CR. Use of immunohistochemistry in melanocytic lesions. *J Cutan Pathol.* 2008; 35:1–10.

23. Wandler A, Spaun E, Steiniche T. Automated quantification of Ki67/MART1 stains may prevent false-negative melanoma diagnoses. *J Cutan Pathol.* 2016;43: 956–962.
24. Nielsen PS, Riber-Hansen R, Jensen TO, Schmidt H, Steiniche T. Proliferation indices of phosphohistone H3 and Ki67: strong prognostic markers in a consecutive cohort with stage I/II melanoma. *Mod Pathol.* 2013;26:404–13.



Graphic 1: Immunohistochemistry results for Kindlin-1 (intensity) and AJCC Stage (Kruskal Wallis Test; $P = 0,89$)



Graphic 2: Immunohistochemistry results for Ki-67 (%) and AJCC Stage (Kruskall Wallis Test; $P = 0,41$)

Table 1. Clinicopathological features of primary melanoma tumor

Variable	<i>N</i>	%
Tumor Site		
Head/neck	2	6,7
Trunk	13	43,3
Upper limb	9	30
Lower limb	6	20
Histological subtype		
Superficial spreading	23	76,7
Lentigo maligna	1	3,3
Nodular	6	20
Clark's level		
I	5	16,7
II	5	16,7
III	5	16,7
IV	15	50
Breslow thickness		
<i>Tis</i>	5	16,7
≤ 1 mm	12	40
1.01 - 2 mm	7	23,3
2.01 - 4 mm	4	13,3
> 4 mm	2	6,7
Presence of ulceration		
Yes	5	16,7
No	25	83,3
Mitosis ratio		
Mean ± SD	2,23 ± 2,97	

Tis = tumor *in situ*; SD = standard deviation

Table 2. Association between biomarkers level and risk and prognostic factors for melanoma (Mann-Whitney test)

Variable	N	<i>P</i>	
		KINDLIN	KI-67
Sunburn episodes		0,83	0,07
Yes	17		
No	13		
Skin phototype I/II		0,51	0,93
Yes	15		
No	15		
Eye color		0,49	0,68
Light	13		
Dark	17		
Presence of ulceration		0,66	0,51
Yes	5		
No	25		
SLN status		0,31	0,37
Positive	5		
Negative	22		
Breslow thickness		0,577	0,377
Mean ± SD	1,47±1,85		
Mitosis rate		0,379	0,727
Mean ± SD	2,23±2,97		

SLN = sentinel lymph node; SD = standard deviation

Table 3. Correlation between stages and pathological features (Spearman's rank)

		<i>Stages*</i>
<i>Mitoses</i>	<i>Correlation coefficient</i>	<i>0,690</i>
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	<i>0,001</i>
	<i>N</i>	<i>30</i>
<i>Breslow</i>	<i>Correlation coefficient</i>	<i>0,839</i>
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	<i>0,001</i>
	<i>N</i>	<i>30</i>
<i>Clark</i>	<i>Correlation coefficient</i>	<i>0,664</i>
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	<i>0,001</i>
	<i>N</i>	<i>30</i>
<i>Kindlin</i>	<i>Correlation coefficient</i>	<i>0,178</i>
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	<i>0,347</i>
	<i>N</i>	<i>30</i>
<i>Ki67</i>	<i>Correlation coefficient</i>	<i>0,247</i>
	<i>Sig. (2-tailed)</i>	<i>0,188</i>
	<i>N</i>	<i>30</i>

* All stages (0, I, II , III and IV).

4. Considerações finais

O presente estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Avaliação de Marcadores Prognósticos no Melanoma”, aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da UFCSPA (Parecer N° 600.248-0) e da ISCMPA (Parecer N° 843.196). Deste projeto maior estão sendo desenvolvidos diversos outros trabalhos e projetos, incluindo uma tese de doutorado.

O Serviço de Cirurgia Oncológica do Hospital Santa Rita é um centro de referência no tratamento de pacientes com melanoma cutâneo primário no estado do Rio Grande do Sul. A parceria com os pesquisadores pertencentes ao grupo de pesquisa em marcadores tumorais da UFCSPA, na área do melanoma, teve início em 2010. Já no câncer de mama, este vínculo se desenvolve há mais tempo, o que é extremamente promissor para o futuro de nossas pesquisas em marcadores tumorais.

O aprimoramento dos estudos, em uma equipe multidisciplinar, permite uma melhor compreensão dos mecanismos biológicos da doença como também dos fatores prognósticos, o que poderá contribuir para um melhor seguimento e tratamento ao paciente.

Protocolo de Melanoma Cutâneo- GBM

Nome: _____

Data de nascimento (usar 4 dígitos para ano): ____ / ____ / ____ . ____ . ____

Endereço (p/ corresp.): _____

Cidade: _____

Estado: _____

CEP: ____ . ____ . ____ / ____ . ____

Tel.: (0XX ____) ____ . ____ . ____ - ____ . ____ . ____

DADOS DO PACIENTE

Data do Preenchimento: (usar 4 dígitos para ano) ____ . ____ / ____ . ____ / ____ . ____ . ____

Sexo: () masculino () feminino

Cor: () B () A () Não Branco

Profissão: () Grande exposição Solar () Sem grande exposição solar

Pcte é residente na cidade acima citada: () sim () não → *se não*: Estado de origem: _____

Naturalidade: () brasileira () estrangeira

FATORES DE RISCO

História Pessoal de melanoma cutâneo -----() sim () não

História Pessoal de CBC ou CEC de pele () sim () não

História Pessoal de outra neoplasia (excluindo CBC/CEC de pele) () sim () não | Se sim, local: _____

História Familiar de CBC ou CEC de pele () sim () não | Se sim: () parente de 1º grau () parente de 2º grau () _____

História Familiar de melanoma----- () sim () não | Se sim: () parente de 1º grau () parente de 2º grau () _____

História Familiar de outra neoplasia interna---- () sim () não | Se sim, qual(is) órgão(s): _____

História Familiar de outra neoplasia interna---- () sim () não | Se sim: () parente de 1º grau () parente de 2º grau () _____

Fototipo de pele I e II----- () sim () não

Pele actínica----- () sim () não

Olhos claros (verdes ou azuis) ----- () sim () não

Cabelos claros (loiros ou ruivos)----- () sim () não

Nevo melanocítico (NM) atípico (comprovado histopatologicamente) () sim () não

NM congênito: () sim () não | se sim: () gigante [$>20 \text{ cm}^2$] () médio () pequeno [$<3 \text{ cm}^2$] | Relacionado ao mel. () sim () não

Nevo melanocítico múltiplo () sim () não | se sim: () <50 () >50

Queimadura solar (episódio marcante, com eritema e eventual/e bolhas) () infância () adulto () ambos () não

Efélides na infância----- () sim () não

Melanoma cutâneo relacionado com gravidez ----- () sim () não

DADOS DO TUMOR PRIMÁRIO			
Data do Diagnóstico (mês/ano): ___/___/___		É tumor Metacrônico ? () Sim () Não	
Idade ao diagnóstico Inicial: ___ . ___ . ___ anos		(aparecimento de novos tumores primários em períodos diferentes)	
Tamanho da Lesão Primária (em mm, aspecto clínico da lesão presente)		X	() sem informação
		___ . ___ . ___ Maior Eixo(mm)	___ . ___ . ___ Menor Eixo(mm)
Localização da Lesão Primária (utilize a codificação da tabela abaixo – marque com um X no local correspondente)			
() T-02000 Não especificado	() T-02153 Sulco naso-labial D	() T-02455 Região dorsal E	() T-02609 Braço D
() T-02101 Fronte D	() T-02164 Sulco naso-labial E	() T-02456A Região dorsal med	() T-02608 Braço E
() T-02103 Fronte E	() T-02167 Região temporal D	() T-02458 Flanco D	() T-02628 Antebraço D
() G-00001 Couro cabeludo D	() T-02168 Região temporal E	() T-02459 Flanco E	() T-02629 Antebraço E
() G-00002 Couro cabeludo E	() G-00003 Região da nuca D	() T-02480 Abdome médio	() T-02648 Mão D
() T-02116 Região pré-auricular D	() G-00004 Região da nuca E	() T-02472 Nádega D	() T-02649 Mão E
() T-02117 Região pré-auricular E	() T-02309 Pescoço D	() T-02473 Nádega E	() T-02808 Coxa D
() T-02124 Região malar D	() T-02308 Pescoço E	() T-02474 Quadril D	() T-02809 Coxa E
() T-02125 Região malar E	() T-02415 Região escapular D	() T-02463 Quadril E	() T-02824 Perna D
() T-02128 Pálpebra D	() T-02416 Região escapular E	() T-02475 Sacral	() T-02825 Perna E
() T-02129 Pálpebra E	() T-02456 Reg. Interescapular	() T-02483 Umbigo	() T-02848 Pé D
() T-02140 Nariz	() T-02428 Mama D	() T-02489 Abdome D	() T-02849 Pé E
() T-02151 Lábio superior	() T-02429 Mama E	() T-02490 Abdome E	() G-00005 Orelha D
() T-02152 Lábio inferior	() T-02427 Reg. esternal	() G-00007 Abd. Médio inf.	() G-00006 Orelha E
() T-02155 Mento	() T-02454 Região dorsal D	() T-02500 Períneo	() G-00008 Localiz. Desc.
		() G-00009 Sub-ungueal, Periungueal	
DADOS CLÍNICOS DO TUMOR ATUAL			
Regressão clínica da Lesão Primária () sim () não () sem informação			
Ulceação clínica da Lesão Primária () sim () não () sem informação			
SITUAÇÃO DO PACIENTE NA ADMISSÃO (clínica) – pode assinalar + de uma alternativa			
() TU primário não avaliável			
() TU primário avaliável → () intacto () inicial biopsiado			
() recidiva → se sim: () local () regional (linfonodal)			
() satelitose ou em trânsito			
() metástase locoregional (linfonodal)			
() metástase à distância → () pele () LN não regional () pulmão () cérebro () fígado () ossos ()			
HISTOPATOLOGIA DA LESÃO PRIMÁRIA – preferencialmente da peça cirúrgica			
() Externo ao serviço que está comunicando → se sim: revisão de lâmina: () sim () não			
ano: Nº exame:			
() MÊS () MN () MAL () LMM () outros (lista)			
Fase de crescimento: () vertical () radial		() <i>in situ</i> → subtipo () MÊS () MAL () LM () não especificado	
Breslow: ___ . ___ . ___ , ___ . ___ (em mm)		Nevo associado ao melanoma () sim () não	
Clark: () I (<i>in situ</i>) () II () III () IV () V			
Ulceação () sim () não			
Índice mitótico: ___ . ___ / 10 CGA			
Invasão vascular / linfática: () sim () não			
Invasão perineural: () sim () não			
Infiltr. Inflam. peritumoral: () sim () não			
Infiltr. Inflam. intratumoral: () sim () não			
Área de regressão : () sim () não			
Nódulos satélites : () sim () não			
Margens: () livres () comprometidas			

TERAPÊUTICA

Tratamento cirúrgico do tumor primário

Data da 1ª cirurgia: . / . / . . .	() nesta Instituição () em outro serviço
() biópsia incisional () biópsia excisional (até 2mm) () desconhecida () margens insuficientes () margens suficientes	Margens cirúrgicas (em cm): ___ . ___ , ___ . ___
Data da 2ª cirurgia: . / . / . . .	() nesta Instituição () em outro serviço
() ressecção completa com margem () ampliação após excisão prévia	Margens cirúrgicas (em cm): ___ . ___ , ___ . ___

TRATAMENTO LOCOREGIONAL

Se LN clinicamente negativos

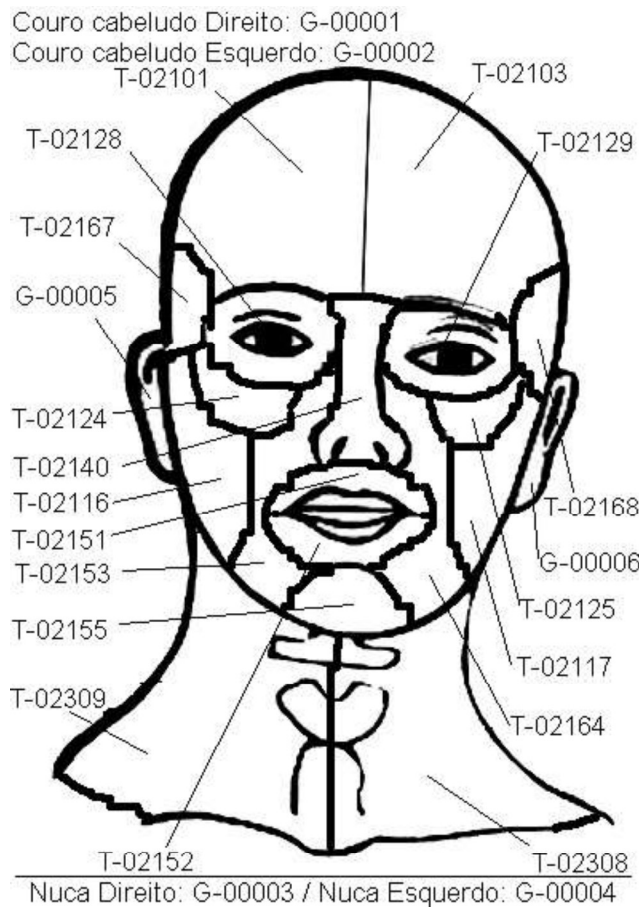
Pesquisa do LN sentinela ()sim ()não Data . / . / . . .			
() Corante vital ()Gama Probe () ambos			
Quantidade de bases de drenagem linfática preferências encontrados na linfocintigrafia: ()1 ()2 ()3 ()4 ()5			
Axilar D	() não explorado () explorado ___ / ___ (LNS patológico / total de LNS)	N.º de LNS marcados na linfocintigrafia → ()1 ()2 ()3 ()4 ()5	
Axilar E	() não explorado () explorado ___ / ___ (LNS patológico / total de LNS)	N.º de LNS marcados na linfocintigrafia → ()1 ()2 ()3 ()4 ()5	
EpitrocLEAR D	() não explorado () explorado ___ / ___ (LNS patológico / total de LNS)	N.º de LNS marcados na linfocintigrafia → ()1 ()2 ()3 ()4 ()5	
EpitrocLEAR E	() não explorado () explorado ___ / ___ (LNS patológico / total de LNS)	N.º de LNS marcados na linfocintigrafia → ()1 ()2 ()3 ()4 ()5	
Cervical D	() não explorado () explorado ___ / ___ (LNS patológico / total de LNS)	N.º de LNS marcados na linfocintigrafia → ()1 ()2 ()3 ()4 ()5	
Cervical E	() não explorado () explorado ___ / ___ (LNS patológico / total de LNS)	N.º de LNS marcados na linfocintigrafia → ()1 ()2 ()3 ()4 ()5	
Inguinal D	() não explorado () explorado ___ / ___ (LNS patológico / total de LNS)	N.º de LNS marcados na linfocintigrafia → ()1 ()2 ()3 ()4 ()5	
Inguinal E	() não explorado () explorado ___ / ___ (LNS patológico / total de LNS)	N.º de LNS marcados na linfocintigrafia → ()1 ()2 ()3 ()4 ()5	
Íliaco D	() não explorado () explorado ___ / ___ (LNS patológico / total de LNS)	N.º de LNS marcados na linfocintigrafia → ()1 ()2 ()3 ()4 ()5	
Íliaco E	() não explorado () explorado ___ / ___ (LNS patológico / total de LNS)	N.º de LNS marcados na linfocintigrafia → ()1 ()2 ()3 ()4 ()5	
Poplíteo D	() não explorado () explorado ___ / ___ (LNS patológico / total de LNS)	N.º de LNS marcados na linfocintigrafia → ()1 ()2 ()3 ()4 ()5	
Poplíteo E	() não explorado () explorado ___ / ___ (LNS patológico / total de LNS)	N.º de LNS marcados na linfocintigrafia → ()1 ()2 ()3 ()4 ()5	
_____ D	() não explorado () explorado ___ / ___ (LNS patológico / total de LNS)	N.º de LNS marcados na linfocintigrafia → ()1 ()2 ()3 ()4 ()5	
_____ E	() não explorado () explorado ___ / ___ (LNS patológico / total de LNS)	N.º de LNS marcados na linfocintigrafia → ()1 ()2 ()3 ()4 ()5	

Anatomia patológica do LNS *positivo*

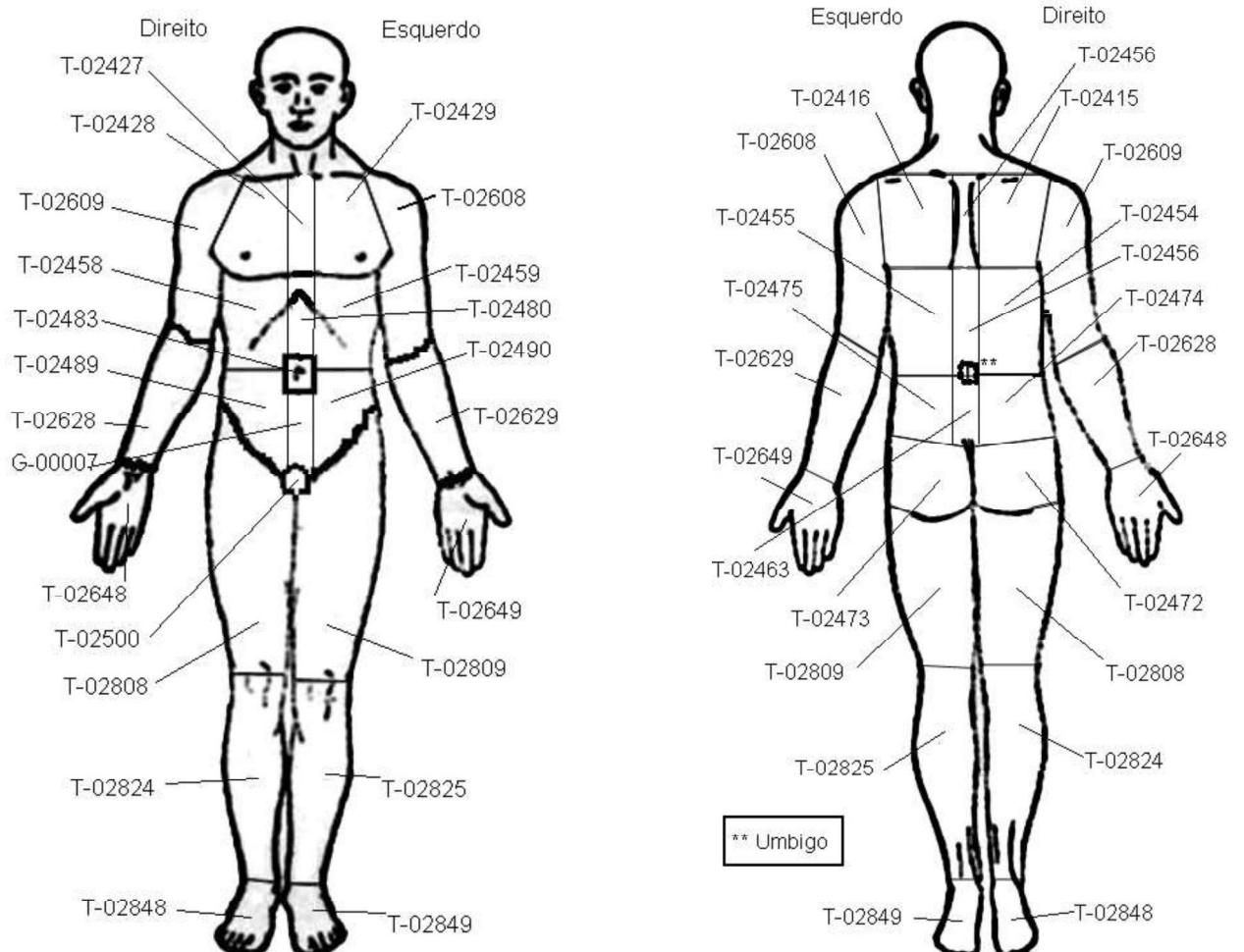
LNS 1: local _____	()HE+	Imuno ()realizada ()não realiz. ()S100+ ()HMB45+ ()MelanA+ () _____ +
LNS 2: local _____	()HE+	Imuno ()realizada ()não realiz. ()S100+ ()HMB45+ ()MelanA+ () _____ +
LNS 3: local _____	()HE+	Imuno ()realizada ()não realiz. ()S100+ ()HMB45+ ()MelanA+ () _____ +
LNS 4: local _____	()HE+	Imuno ()realizada ()não realiz. ()S100+ ()HMB45+ ()MelanA+ () _____ +
LNS 5: local _____	()HE+	Imuno ()realizada ()não realiz. ()S100+ ()HMB45+ ()MelanA+ () _____ +

Linfadenectomia se: ()LN clinicamente positivos ()LNS <i>positivo</i> ()Eletiva Data . / . / . . .	
Axilar D	___ / ___ (LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Axilar E	___ / ___ (LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
EpitrocLEAR D	___ / ___ (LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
EpitrocLEAR E	___ / ___ (LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Cervical D	___ / ___ (LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Cervical E	___ / ___ (LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Inguinal D	___ / ___ (LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Inguinal E	___ / ___ (LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Íliaco D	___ / ___ (LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Íliaco E	___ / ___ (LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Poplíteo D	___ / ___ (LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Poplíteo E	___ / ___ (LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Outra localiz. _____ D	___ / ___ (LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Outra localiz. _____ E	___ / ___ (LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)

Se estádio IV: ()DHL normal ()DHL aumentada		
Estadiamento Final - AJCC Ano: 2002		
TNM	T	()T0 ()Tx ()Tis ()T1a ()T1b ()T2a ()T2b ()T3a ()T3b ()T4a ()T4b
	N	()N0 ()Nx ()N1a ()N1b ()N2a ()N2b ()N2c ()N3
	M	()M0 ()Mx ()M1a ()M1b ()M1c – DHL normal ()M1c – DHL aumentada
Estádio ()0 ()IA ()IB ()IIA ()IIB ()IIC ()IIIA ()IIIB ()IIIC ()IV(M1a) ()IV(M1b) ()IV(M1c- DHL normal) ()IV(M1c- DHL aumentada)		
Tratamento Neoadjuvante, Adjuvante ou Terapêutico		
Tratamento Neoadjuvante	()bioQT ()QT ()RT ()outro: _____	
Tratamento Adjuvante	()bioQT ()QT ()RT ()vacina autóloga ()vacina peptídeo ()IFN ()outro: _____	
Terapêutico	()bioQT ()QT ()RT ()vacina autóloga ()vacina peptídeo ()perfusão ()infusão ()imunoterapia intralesional ()LASER CO2 ()outro: _____	
INTERVALO LIVRE DE DOENÇA		
Recidiva: () local () locorregional (trânsito ou linfonodal) Data . / . / . . .		
Primeira alteração de estágio Data . / . /		
estádio: ()IIIA ()IIIB ()IIC ()IV(M1a) ()IV(M1b) ()IV(M1c- DHL normal) ()IV(M1c- DHL aumentada)		
Segunda alteração de estágio Data . / . /		
estádio: ()IV(M1a) ()IV(M1b) ()IV(M1c- DHL normal) ()IV(M1c- DHL aumentada)		
Status do Paciente na última avaliação: data . / . / . . .		
()vivo sem doença ()morto por melanoma cutâneo ()morto por causa ignorada ()vivo com doença ()morto por outra causa ()sem informação		



Obs: a área anatômica mediana do esquema abaixo mede 5,0 cm de largura



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de Marcadores Prognósticos no Melanoma

Pesquisador: Claudia Giuliano Bica

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 14404513.4.3001.5345

Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 600.248-0

Data da Relatoria: 21/11/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado da aluna Munique Pereira Mendonça, orientado pela Profa. Cláudia G. Bica. Neste estudo, pacientes com diagnóstico de melanoma, provenientes do Núcleo de Melanoma do Hospital Santa Rita, serão seguidos semestralmente durante dois anos e avaliados quanto a identificação de potenciais biomarcadores que possam influenciar no prognóstico do mesmo. A presença de biomarcadores será comparada com população controle sem melanoma.

O referido projeto será realizado no Complexo da Santa Casa onde já recebeu aprovação do CEP. A Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) será centro coparticipante uma vez que algumas análises moleculares e bioquímicas serão realizadas no Laboratório de Patologia da Pós-Graduação da UFCSPA.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral do projeto é avaliar o potencial de marcadores moleculares no prognóstico do melanoma maligno cutâneo.

Os objetivos secundários do estudo são: I. Comparar os parâmetros inflamatórios/oxidativos e a quantidade de cell-free DNA entre indivíduos hígidos e portadores de melanoma. II. Quantificar os níveis de cell-free DNA (cfDNA) de pacientes com melanoma; III. Estabelecer o perfil inflamatório/oxidativo dos pacientes portadores da doença; IV. Identificar a expressão de

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)303 -8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 600.248-0

moléculas de adesão nas peças cirúrgicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

o projeto não oferece maiores riscos aos pacientes, uma vez que serão aproveitados a sobra de sangue dos exames de rotina realizados no Hospital Santa Rita da ISCMPA para o estudo. Exames esses feitos assistencialmente, rotineiramente.

Embora sem benefícios diretos poderá auxiliar na identificação de fatores que possam auxiliar prognóstico da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é relevante e exequível. O mesmo já foi aprovado pelo CEP da Santa Casa. A Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) será centro coparticipante uma vez que algumas análises moleculares e bioquímicas serão realizadas no Laboratório de Patologia da Pós-Graduação da UFCSPA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos regulatórios estão adequados. Possui carta de concordância das instituições.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está dentro dos padrões e julgo que o mesmo possa ser aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data de início 23/10/13

Data de término 06/03/17

Endereço: Rua Sarmento 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: 600.248-0

PORTO ALEGRE, 11 de Abril de 2014

Assinador por:
José Geraldo Vernet Taborda
(Coordenador)

Este parecer reemitido substitui o parecer número 600248 gerado na data 22/11/2013 18:40:41, onde o número CAAE foi alterado de 14404513.4.0000.5335 para 14404513.4.3001.5345.

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

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de Marcadores Prognósticos no Melanoma

Pesquisador: Claudia Giuliano Bica

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 14404513.4.0000.5335

Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 843.196

Data da Relatoria: 25/09/2014

Apresentação do Projeto:

Solicitação de Emenda, referente:

-Projeto modificado 20/08/2014: critérios de inclusão para pacientes.

-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, modificado - Versão 3.0 datada de 23/09/2013.

_Inclusão de Pesquisador: Luciana Schuch.

Objetivo da Pesquisa:

Já descrito no parecer anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequados e já apresentados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Solicitação de Emenda referente ao critérios de Inclusão, TCLE modificado e inclusão de pesquisadora, todos apresentados em anexo e adequados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Não se aplica.

Endereço: R. Profº Annes Dias,285 Hosp.Dom Vicente Scherer

Bairro: 6º andar - Centro

CEP: 90.020-090

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8571

Fax: (51)3214-8571

E-mail: cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 843.196

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Solicitamos no TCLE, modificado - Versão 3.0 datada de 23/09/13, retirar onde cita a resolução 196/96, trocar para Resolução nº.: 466/12 vigente!.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Após reavaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

-Projeto modificado 20/08/2014: critérios de inclusão para pacientes.

-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, modificado - Versão 3.0 datada de 23/09/2013.

_Inclusão de Pesquisadora: Luciana Schuch.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 – Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Endereço: R. Profº Annes Dias,285 Hosp.Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 843.196

PORTO ALEGRE, 23 de Outubro de 2014

Assinado por:
Claudio Teloken
(Coordenador)

Endereço: R. Profº Annes Dias,285 Hosp.Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Versão 3.0 - 23/09/2013

Título do projeto: “Avaliação de Marcadores Prognósticos no Melanoma”

Você está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) deste estudo, uma vez que possui diagnóstico de melanoma (câncer de pele). O objetivo desta pesquisa é buscar informações (marcadores) que possam auxiliar na previsão do resultado da sua doença (prognóstico).

O seu tratamento prevê consultas de três em três meses com seu oncologista, onde serão realizados exames para acompanhar sua doença. Pedimos a sua autorização para que o nosso grupo faça um acompanhamento dos dados dessas suas consultas e para que nos seja doado um pouco do seu sangue. Para esta doação, não será necessária uma nova coleta de sangue, pois aproveitaremos a parte que sobra do seu material coletado em seu exame de rotina e que depois seria descartado. O sangue doado a pesquisa será guardado em tubo plástico e refrigerado pelo tempo que este estudo for conduzido.

Gostaríamos de pedir a sua autorização para utilizarmos em nosso estudo o seu material retirado para o diagnóstico da doença (biópsia) e, caso venha a ocorrer uma cirurgia para retirada do tumor, pedimos que você nos autorize previamente a usarmos uma parcela deste material (tumor-bloco), o qual é armazenado no Laboratório de Patologia da Santa Casa.

Salientamos que este estudo não oferece riscos à sua saúde, pois os materiais biológicos utilizados serão aqueles descritos acima, ou seja, não requerem uma nova coleta exclusiva para fins deste estudo. Entretanto, as suas informações contidas no prontuário serão de acesso da equipe do estudo, a qual garante a realização de todas as medidas cabíveis para que os seus dados sejam mantidos em sigilo absoluto.

Os dados obtidos serão utilizados apenas pela equipe do estudo e autoridades regulatórias da área da saúde, sendo os mesmos armazenados pela pesquisadora principal durante 5 (cinco) anos e após totalmente destruídos (conforme preconiza a Resolução 196/96). Caso você queira colaborar além do que já foi solicitado, pedimos a sua opinião quanto ao uso destes dados para comparação com estudos posteriores referentes exclusivamente ao entendimento da sua doença:

() SIM, autorizo a utilização dos dados gerados para comparações com estudos futuros, desde que estes também sejam aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

() NÃO autorizo a utilização dos dados gerados para comparações com estudos futuros. Ressaltamos que este trabalho possui **exclusivamente** caráter científico, ou seja, você não será identificado (a) em nenhum momento da pesquisa e seu anonimato será garantido. Portanto, não haverá o estabelecimento de nenhuma relação de diagnóstico, nem tampouco os resultados desta pesquisa terão efeito sobre a sua conduta clínica.

A sua participação é inteiramente voluntária. Se você se sentir, por qualquer motivo, desconfortável em participar deste estudo, poderá desistir. A retirada de consentimento ocorrerá sem que haja qualquer prejuízo em seu tratamento.

Informamos que este estudo não envolverá custos para você e que, da mesma forma, não haverá remuneração por participar desta pesquisa. O seu benefício dar-se-á por meio dos **resultados científicos desta pesquisa** após a conclusão do projeto. *Você não se beneficiará imediatamente deste estudo, entretanto o conhecimento adquirido poderá contribuir futuramente para o melhor entendimento da sua doença.*

Eu, _____ (paciente ou responsável) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito do estudo e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A Srta. Munique P. Mendonça (pesquisadora) certificou-me de que todos os dados desta pesquisa referentes ao estudo serão confidenciais, bem como o meu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, frente a estas informações.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar Munique P. Mendonça no telefone (51) 95295124 ou a Claudia G. Bica telefone (51) 84197210 **Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre no telefone (51) 3214 8571 ou ao Comitê de Ética da UFCSPA pelo fone (51) 33038804.**

Nome do participante por extenso
(letra de forma)

Data da assinatura do
termo

Assinatura do participante

“Declaro que esclareci os objetivos do projeto de forma clara, da justificativa e dos procedimentos a que serão submetidos, bem como dos riscos, desconfortos e benefícios do presente trabalho. Também discuto e esclareço dúvidas sobre a pesquisa. Atesto que assino e entrego uma cópia idêntica do termo de consentimento ao participante”.

Nome do pesquisador que aplicou o TCLE
(letra de forma)

Data da aplicação do
termo

Assinatura do pesquisador que aplicou o TCLE e carimbo