Sheyla Batista Bologna

**Melanoma primário da mucosa oral: estudo dos
aspectos clínico-patológicos e da expressão das
imunoglobulinas e integrinas em 35 casos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Programa de Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço

**São Paulo
2013**

Sheyla Batista Bologna

Melanoma primário da mucosa oral: estudo dos aspectos clínico-patológicos e da expressão das imunoglobulinas e integrinas em 35 casos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bologna, Sheyla Batista

Melanoma primário da mucosa oral : estudo dos aspectos clínico-patológicos e da expressão das imunoglobulinas e integrinas em 35 casos / Sheyla Batista Bologna. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.

Orientador: Silvia Vanessa Lourenço.

Descritores: 1.Melanoma 2.Mucosa oral 3. Moléculas de adesão celular
4.Integrinas 5.Imunoglobulinas

USP/FM/DBD-298/13

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: sistema autor-data; adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3.a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

DEDICO ESTA TESE...

Aos meus pais, Selma e Valdir, exemplos de integridade, determinação e grandes incentivadores. Agradeço pelo imenso apoio, amizade, dedicação e amor incondicional. Vocês foram fundamentais na minha formação moral.

Às minhas irmãs, Vanessa e Danielle, pela amizade, carinho e cumplicidade.

Aos meus avós, Maria José e Paulo, pelas bases morais e familiares e pela total dedicação.

Ao meu marido, Vitor Pontes Novaes Guimarães Lopes, pelo grande amor, companheirismo e amizade. Nada seria possível sem a sua presença e o imenso apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Silvia Vanessa Lourenço, que me iniciou na vida acadêmica, um exemplo de profissional, agradeço por todas as oportunidades, pela amizade, carinho, dedicação, confiança, incentivo e paciência em todos os momentos.

Ao Professor Doutor Marcello Menta Simonsen Nico agradeço pelos brilhantes ensinamentos e pela confiança em mim depositada durante todos esses anos.

À Professora Doutora Mírian Nacagami Sotto, pela oportunidade e incentivo.

Às Professoras Doutoras Neusa Yuriko Sakai Valente e Adriana da Costa Neves pelas valiosas sugestões.

À Professora Doutora Cláudia Malheiros Coutinho-Camilo, exemplo de pesquisadora, pela grande contribuição neste trabalho.

À minha amiga, Tathyane Harumi Nakajima Teshima, pelo imenso apoio durante todo este período e pela dedicação no auxílio da confecção desta tese.

À Cibeles Pidorodeski Nagano, pela grande ajuda na obtenção dos dados clínicos dos casos inseridos neste estudo.

À Sra. Eli Maria Ferreira, pela disposição e auxílio administrativo.

À CAPES, pela bolsa de Doutorado no programa Demanda Social.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 Melanócitos.....	6
3.2 Aspectos gerais dos melanomas.....	8
3.2.1 Melanomas cutâneos – uma breve revisão.....	8
3.3 Melanomas mucosos primários.....	11
3.3.1 Epidemiologia e etiopatogenia.....	11
3.4 Melanomas primários das mucosas da cabeça e pescoço.....	13
3.5 Melanoma primário da mucosa oral.....	15
3.6 Moléculas de adesão.....	21
3.6.1 Integrinas.....	24
3.6.2 Imunoglobulinas.....	26
4. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Amostras.....	31
4.2 Critérios de inclusão.....	31
4.3 Critérios de exclusão.....	31
4.4 Coleta de dados clínicos.....	32
4.5 Análise morfológica dos melanomas.....	32

4.6 Confeção do “tissue microarray”	32
4.7 Análise imunoistoquímica do “tissue microarray” de melanomas.....	33
4.8 Análise estatística dos dados	35
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Resultados clínicos.....	38
5.2 Resultados morfológicos.....	44
5.3 Resultados imunoistoquímicos.....	54
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÕES.....	71
9. REFERÊNCIAS.....	73

APÊNDICES

Apêndice 1 - Termo de aprovação do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq).

Apêndice 2 - Artigo publicado na revista The American Journal of Dermatopathology em Julho de 2013.

Apêndice 3 - Artigo publicado na revista The American Journal of Dermatopathology em Junho de 2009.

Apêndice 4 - Artigo publicado na revista The American Journal of Dermatopathology em Abril de 2013.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALCAM	do inglês <i>activated leukocyte adhesion molecule</i>
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSA	do inglês <i>bovine serum albumin</i>
CEACAM	do inglês <i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules</i>
c-KIT	v-kit hardy-zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
EGF	do inglês <i>epidermal growth factor</i>
et al.	e outros
F	feminino
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	hematoxilina-eosina
HMB-45	do inglês <i>human melanoma Black-45</i>
ICAM	do inglês <i>intercellular adhesion molecule</i>
L1CAM	do inglês <i>leukocyte-1 cell adhesion molecule</i>
M	masculino
MCAM	do inglês <i>melanoma cell adhesion molecule</i>
MEC	matriz extracelular
Melan-A	do inglês <i>melanocyte antigen</i>
MELCAM	do inglês <i>melanoma cell adhesion molecule</i>
MPMO	melanoma primário da mucosa oral
MUC	mucina

PBS	do inglês <i>phosphate buffer saline</i>
PDGF	do inglês <i>platelet-derived growth factor</i>
S100	solúvel 100% em sulfato de amônio
SFB	do inglês <i>serum fetal bovine</i>
Src	v-src avian sarcoma – Schmidt-Ruppin A—viral 2 oncogene homolog
TMA	do inglês <i>tissue microarray</i>
VCAM	do inglês <i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
g	grama
mm	milímetro
µm	micrometros
%	por cento

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos, clones, procedência e detalhes do protocolo.....	35
Tabela 2	Dados clínico-demográficos dos melanomas primários da mucosa oral.....	41
Tabela 3	Detalhes histopatológicos dos melanomas primários da mucosa oral.....	45
Tabela 4	Localização, nível histológico* e medidas máximas dos melanomas orais incluídos no TMA.....	46
Tabela 5	Relação entre a expressão de integrinas e aspectos clínico-patológicos dos melanomas primários da mucosa oral.....	55
Tabela 6	Relação entre a expressão de imunoglobulinas e aspectos clínico-patológicos dos melanomas primários da mucosa oral.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação gráfica da distribuição do melanoma primário da mucosa oral segundo o gênero.....	39
Figura 2	Representação gráfica da distribuição do melanoma primário da mucosa oral segundo o grupo étnico.....	39
Figura 3	Representação gráfica da distribuição do melanoma primário da mucosa oral segundo a distribuição anatômica.....	40
Figura 4	Aspectos clínicos e macroscópicos do melanoma oral.....	42
Figura 5	Representação gráfica da análise dos níveis de profundidade dos melanomas primários da mucosa oral.....	47
Figura 6	Aspectos histopatológicos dos melanomas primários da mucosa oral	48
Figura 7	Detalhes dos aspectos histopatológicos dos melanomas primários da mucosa oral.....	50
Figura 8	“ <i>Tissue microarray</i> ” (TMA) contendo 53 espécimes de melanoma oral provenientes de 34 doentes.....	52
Figura 9	Expressão de integrinas nos casos de melanoma primário da mucosa oral.....	56
Figura 10	Expressão de imunoglobulinas nos casos de melanoma primário da mucosa oral.....	59

Bologna SB. *Melanoma primário da mucosa oral: estudo dos aspectos clínico-patológicos e da expressão das imunoglobulinas e integrinas em 35 casos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Melanoma primário da mucosa oral (MPMO) é um tumor raro e agressivo. Estudos recentes demonstraram uma correlação entre o aumento da invasão tumoral e o fenótipo metastático com uma alteração no padrão de expressão das moléculas de adesão. Neste estudo analisamos a expressão de integrinas e imunoglobulinas nos melanomas primários da mucosa oral e relacionamos os resultados com os parâmetros clínicos. As análises imunoistoquímicas dos padrões de expressão destas moléculas foram realizadas em 35 casos de melanomas primários da mucosa oral, e os resultados foram correlacionados com características clínicas e histológicas. Observou-se que a subunidade beta-4 de integrina foi negativa em casos com invasão vascular. A presença de integrina beta-3 e de CD166 (ALCAM) estavam estatisticamente associadas à extensa invasão vascular ($p < 0,05$). A menor expressão de CD54 (ICAM) foi marginalmente relacionada a casos com necrose extensa, enquanto a maioria dos casos com doença metastática foi negativa para CD66 (CEACAM). Conclusão: padrões alterados de expressão de moléculas de adesão, principalmente integrinas e imunoglobulinas, podem participar da patogênese e do desenvolvimento dos melanomas primários da mucosa oral.

Descritores: 1.Melanoma 2.Mucosa oral 3. Moléculas de adesão celular 4.Integrinas 5.Imunoglobulinas

SUMMARY

Bologna SB. *Primary oral mucosal melanomas: Study of clinical-pathological aspects and immunoglobulin and integrins expression in 35 cases* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Primary oral mucosal melanoma is a rare and an aggressive tumor. Recent studies have demonstrated the correlation among increased tumor invasion, the metastatic phenotype and altered adhesion molecule expression profiles. The present study analyzed the expression of integrins and immunoglobulin-like adhesion molecules in oral mucosal melanomas and correlated results with clinical parameters. Immunohistochemical analyses of their expression patterns were performed on thirty-five cases of primary oral mucosal melanomas. The results were correlated with clinical and histological features of the cohort. The beta-4 subunit of integrin was negative and this was related with vascular invasion. Positivity of integrin beta-3 and CD166 (ALCAM) was statistically associated with extensive vascular invasion ($p < 0.05$). Lower expression of CD54 (ICAM) was associated with cases with extensive necrosis. Most cases with metastatic disease were negative for CD66 (CEACAM). Conclusion: Altered patterns of adhesion molecule expression, mainly integrins and immunoglobulin-like proteins, may participate in the pathogenesis and outcome of primary oral mucosal melanomas.

Descriptors: 1.Melanoma 2.Oral mucosa 3.Cell adhesion molecules 4.Integrins 5.Immunoglobulins

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é um tipo de neoplasia que pode acometer todos os órgãos e tecidos nos quais se observa migração de células da crista neural. Apesar de corresponder a somente 3% de todos os tumores malignos da pele, é responsável por cerca de 60% de todas as mortes por neoplasias cutâneas (Kuphal e Bossenhoff, 2009).

Os melanomas de mucosa compreendem aproximadamente 1% de todos os melanomas e têm um comportamento biológico mais agressivo comparado ao que se observa nos melanomas cutâneos por apresentarem maior taxa de comprometimento metastático para linfonodos e outros órgãos regionais e distantes, os quais resultam num índice maior de mortalidade (Lengyel et al, 2003). As mucosas mais comumente acometidas pelos melanomas estão na região da cabeça e pescoço (55%), região anal/retal (24%), trato genital feminino (18%) e trato urinário (3%), sendo a incidência do melanoma oral menor que 1,2 casos por 10 milhões de pessoas por ano (Hicks e Flaitz, 2000).

Pouco se sabe a respeito da patogenia e os aspectos biológicos dos melanomas das mucosas, ao contrário dos diversos estudos encontrados em melanomas cutâneos. Assim, este trabalho apresenta uma pesquisa que visa ampliar os conhecimentos básicos e possivelmente aplicados a respeito dos melanomas da mucosa oral.

2.OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais

Estudar os aspectos morfológicos e os padrões de expressão das integrinas e imunoglobulinas em melanomas primários da mucosa oral.

Objetivos específicos

1. Analisar morfollogicamente os padrões dos melanomas primários da mucosa oral;
2. Analisar os padrões de expressão das principais famílias de moléculas de adesão – integrinas (alfa-2, alfa-3, alfa-4, alfa-5, alfa-6 e alfa-v) e imunoglobulinas (CD54, CD66, CD146 E CD166) em melanomas primários da mucosa oral através da técnica de imunoistoquímica em “tissue microarray”;
3. Associar os padrões morfológicos dos melanomas primários da mucosa oral aos padrões de expressão de moléculas de adesão.

3.REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MELANÓCITOS

Os melanócitos são células derivadas da crista neural que migram para a pele e mucosas durante a embriogênese. Em adultos, sua distribuição e quantidade final são relativamente constantes, exibindo pequenas alterações provocadas por estímulos da radiação ultravioleta. Uma vez diferenciadas em melanócitos, estas células produzem um produto pigmentado, a melanina – pigmento castanho-enegrecido, cujas funções principais incluem a absorção da radiação ultravioleta e depuração de intermediários citotóxicos. A melanina é empacotada em melanossomos, vesículas citoplasmáticas esféricas que representam partículas elétron-densas similares aos lisossomos (Quevedo e Fleishmann, 1980; Prota, 1980; Hicks e Flaitz, 2000).

Na mucosa oral, o número e a distribuição dos melanócitos são semelhantes aos do epitélio cutâneo, variando na sua proporção, assim como a quantidade de melanócitos em leucodermas, melanodermas ou xantodermas também é similar (Hicks e Flaitz, 2000). Estas células estão localizadas ao longo dos prolongamentos epiteliais do revestimento mucoso, concentrando-se em suas extremidades. Na pele, sua função é protegê-la contra os efeitos da radiação solar, porém sua fundamental importância na mucosa oral permanece incerta (Quevedo e Fleishmann, 1980; Hicks e Flaitz, 2000).

Assim como no epitélio cutâneo, os melanócitos da mucosa oral também produzem pigmento nos melanossomos, porém, a quantidade de melanina produzida é menor que a de áreas foto-expostas. Apesar disso, variações na

pigmentação da mucosa são frequentemente relatadas, principalmente entre os diferentes grupos étnicos (Hicks e Flaitz, 2000).

Na pele, os melanócitos estão intimamente relacionados aos queratinócitos: cada melanócito se relaciona com aproximadamente 36 queratinócitos, e esta associação é denominada unidade melânica epidérmica (Parichy et al, 2006). Por meio da formação de processos dendríticos, os melanossomos são transferidos para o citoplasma dos queratinócitos e, uma vez incorporados, eles são capazes de conferir a função protetora a essas células epiteliais (Prota, 1980; Quevedo e Fleishmann, 1980; Elder e Elenitsas, 1997; Hicks e Flaitz, 2000).

Morfologicamente, os melanócitos são caracterizados por exibir dendritos citoplasmáticos contendo melanossomos e estão dispostos de forma solitária de permeio às células basais do epitélio cutâneo/mucoso. Na mucosa oral a morfologia dos melanócitos é similar, apresentando núcleos redondos e escuros frequentemente circundados por halo claro e um citoplasma indistinto (Hicks e Flaitz, 2000).

No melanoma, os melanócitos neoplásicos caracterizam-se por uma proliferação descontrolada, atipia morfológica e perda da inibição por contato (característica importante dos melanócitos normais), distribuindo-se em ninhos, grupos ou lençóis celulares. Essas células também apresentam acentuado pleomorfismo, podendo exibir núcleos grandes, irregulares, hipercromáticos e por vezes múltiplos, nucléolos proeminentes e atividade mitótica intensa. Analisadas em conjunto, essas células oferecem critérios importantes para se obter o diagnóstico morfológico da doença (Hicks e Flaitz, 2000).

3.2 ASPECTOS GERAIS DOS MELANOMAS

3.2.1 MELANOMAS CUTÂNEOS – UMA BREVE REVISÃO

O melanoma é uma doença que atinge majoritariamente a fase adulta e que exibe um padrão de incidência equivalente em relação ao gênero, variando de acordo com localização anatômica (Radovic-Kovacevic et al., 1997; Bulliard, 2000). O melanoma cutâneo pode ocorrer em qualquer região anatômica e acomete principalmente o tronco no sexo masculino e as extremidades no sexo feminino (Balch et al., 2009).

Em 1972, uma classificação formal foi desenvolvida em uma conferência de consenso realizada durante a reunião conjunta do “International Union Against Cancer” e o “International Pigment Cell Society” em Sidney, Austrália, sendo então, atualizada em 1982 (McGovern et al., 1986). Esta classificação inclui os 4 maiores subtipos de melanoma: melanoma extensivo superficial, lentigo maligno melanoma, melanoma acral lentiginoso e melanoma nodular. Esta distinção é baseada nas características histológicas da lesão, na região anatômica afetada e no grau dos danos solares no tecido adjacente. A distinção entre o melanoma extensivo superficial, o lentigo maligno melanoma e o melanoma acral lentiginoso é baseada no padrão da fase de crescimento radial. O melanoma nodular foi proposto como uma quarta categoria para lesões que não apresentam a fase de crescimento radial, estendendo-se muito além do componente da fase de crescimento vertical (McGovern et al., 1986). Além disso, de acordo com a atual classificação da Organização Mundial da Saúde dos tumores cutâneos publicada em 2006, incluíram-se outros subtipos

de melanoma: melanoma desmoplásico, melanoma decorrente do nevo azul, melanoma decorrente do nevo gigante congênito, melanoma da infância e melanoma nevoide (LeBoit et al., 2006).

É bem estabelecido que a maioria dos melanomas progridem através de uma fase de crescimento indolente, exibindo um aspecto clínico de lesões irregulares, variavelmente pigmentadas e lesões planas com margens periféricas irregulares (Clark et al., 1984). Esta fase é denominada fase de crescimento radial e caracteriza-se pela propagação radial ou horizontal progressiva. Tal proliferação está usualmente confinada à epiderme (melanoma *in situ*) mas pode também apresentar microinvasão na derme superficial, representando um estágio de desenvolvimento quase sempre completamente curável por meio de excisão cirúrgica. Melanoma microinvasivo é definido como melanoma invasivo na porção superficial da derme; nesse tipo de melanoma, nenhum grupo de células neoplásicas da derme é maior que os localizados na epiderme (Elder, 2006). Em um estágio mais avançado, a lesão pode formar nódulos expansivos ou pode infiltrar a derme reticular ou o tecido adiposo subcutâneo. Esta fase é denominada de crescimento vertical, e nela se observa a presença de ninhos na derme maiores que qualquer ninho epidérmico (Balch et al., 2009). A detecção do melanoma neste estágio se traduz em fase avançada da neoplasia e maior probabilidade de metástase; seu prognóstico é diretamente relativo à profundidade de invasão (Breslow, 1970) bem como a outros parâmetros histológicos (Clark et al., 1969, Balch et al., 1980; Elder et al., 1980; Day et al., 1981; Day et al., 1982a; Day et al., 1982b; Day et al., 1982c; Day et al., 1982d; Harrist et al., 1984; Balch e Milton, 1985; Leon et al., 1991; Lefevre et al., 2003).

Há duas medidas importantes que fazem parte dos protocolos dos laudos dos melanomas – medidas de Breslow e de Clark. O índice de Breslow é baseado na avaliação numérica da espessura tumoral a partir da superfície cutânea, medindo-se a partir da porção superior da camada granulosa da epiderme ou, caso a superfície esteja ulcerada, a partir da base da úlcera até a célula presente mais profundamente na invasão (Breslow, 1970; Balch et al., 2009). Por sua vez, os níveis de Clark representam a profundidade da invasão tumoral baseando-se nas estruturas anatômicas da pele e são definidos da seguinte forma (Clark et al., 1969):

- Nível I: células de melanoma confinadas na epiderme (melanoma *in situ*);

- Nível II: células de melanoma invadindo, mas não preenchendo ou expandindo a derme papilar (superficial);

- Nível III: células de melanoma preenchendo ou expandindo a derme papilar, com extensão do tumor para a interface da derme papilar-reticular;

- Nível IV: células de melanoma infiltrando a derme reticular;

- Nível V: células de melanoma invadindo tecido adiposo subcutâneo.

O prognóstico dos pacientes com melanoma cutâneo está principalmente associado à espessura do tumor. Entretanto, outros fatores também são importantes, tais como taxa de mitose na derme, presença de ulceração, nível de invasão e localização anatômica, bem como características do paciente como sexo e idade (Balch et al, 2009).

3.3 MELANOMAS MUCOSOS PRIMÁRIOS

3.3.1 EPIDEMIOLOGIA E ETIOPATOGENIA

O melanoma de mucosa parece ser particularmente um subtipo de melanoma agressivo e apresenta características epidemiológicas distintas quando comparado ao melanoma cutâneo. Pode acometer qualquer superfície mucosa, porém, a maioria ocorre nas mucosas da cabeça e pescoço, mucosa anal/retal, ou mucosa vulvo-vaginal (Postow et al., 2012). O primeiro caso de melanoma de mucosa na literatura inglesa foi relatado por Lincoln em 1885, segundo pesquisa histórica de Seetharamu e colaboradores em 2010.

Apenas 1,4% de todos os melanomas representam os melanomas mucosos, que geralmente se desenvolvem em idades mais avançadas, com idade média ao diagnóstico de 70 anos (Postow et al., 2012; Mihajlovic et al., 2012). Ao contrário do melanoma cutâneo, acometem mais comumente as mulheres, resultando em uma média de 1,85 mulheres para cada homem (McLaughlin et al., 2005; Postow et al., 2012). Tal predominância ocorre supostamente devido à frequência de melanoma vulvo-vaginal, o subtipo mais comum que ocorre em mulheres (Chang et al., 1998).

Geralmente, o diagnóstico dessa lesão é tardio devido à sua localização anatômica obscura e ausência de sinais e sintomas iniciais, e seus fatores de risco ainda não estão bem definidos (Chang et al., 1998; Mihajlovic et al., 2012). A radiação solar é um fator conhecido para o melanoma cutâneo, porém é improvável que esteja envolvida na patogenia do melanoma da mucosa, uma vez que este tipo de tumor se desenvolve em locais que não estão expostos à

luz solar. Alguns estudos sugerem que a exposição ao formaldeído seja um fator de risco para o melanoma sinonasal, porém seu papel ainda não está bem estabelecido (Holmstrom e Lund, 1991; Thompsom et al., 2003; Seetharamu et al., 2010).

Recentemente, a patogenia do melanoma vem sendo associada a alterações e mutações genéticas específicas principalmente devido ao avanço de técnicas laboratoriais em biologia molecular. Supostamente, as alterações do oncogene BRAF são as mais bem caracterizadas, em particular a mutação BRAF V600E, e encontradas em cerca de 75% dos melanomas de áreas expostas à luz solar, apesar de serem consideradas incomuns nos melanomas de mucosa (Davies et al., 2002; Cruz et al., 2003; Rimoldi et al., 2003; Curtin et al., 2005).

Em 2006, Curtin e colaboradores relataram a presença de mutações de ganho de função (especificamente K642E, L576P, D816H, e V559A), amplificações de gene e superexpressão do receptor de tirosina-quinase c-KIT, a qual foi detectada em 15 (39%) dos 38 casos analisados de melanoma de mucosa. Em contrapartida, Rivera e colaboradores relataram em 2008 a expressão de c-KIT em 88% dos casos de melanoma da mucosa oral, ao passo que 22% dos casos apresentavam mutações ativadoras.

O c-KIT é um regulador chave de crescimento, diferenciação, migração e proliferação dos melanócitos (Lennartsson et al., 2005) que está relacionado a numerosas vias de sinalização intracelular envolvidas na progressão tumoral, tais como a 3-quinase/AKT, Src, proteína quinase ativada por mitógeno, Janus quinase, transdutores de sinal e ativadores de transcrição e vias de fosfolipase C-g (Ali e Ali, 2007). Estes dados sugerem que o melanoma de mucosa seja

uma entidade com características especiais e que informações prognósticas e terapêuticas disponíveis para o melanoma cutâneo não se aplicam necessariamente aos melanomas de mucosa (Seetharamu et al., 2010).

3.4 MELANOMAS PRIMÁRIOS DAS MUCOSAS DA CABEÇA E PESCOÇO

A primeira publicação de um caso de melanoma de mucosa da cabeça e pescoço foi de Weber em 1859, e reconhecida como entidade clínica distinta, e chamado de “sarcoma melanótico” em 1869 (Gavriel et al; 2011). Este tumor abrange cerca de 0,7 a 3,8% de todos os casos de melanoma e, envolvem em ordem decrescente de frequência a cavidade sinonasal, cavidade oral, faringe, laringe e porção superior do esôfago (Manolidis e Donald, 1997; Gavriel et al., 2011).

O local mais comum de ocorrência do melanoma da mucosa de cabeça e pescoço é o trato aerodigestivo superior, sendo a região sinonasal e a cavidade oral os locais mais comumente acometidos (Gavriel et al., 2011). Observa-se uma discreta predominância da doença na região sinonasal, aproximadamente 59 – 80% dos casos, em comparação com a região oral, que exibe apenas 16 – 41% (Patel et al., 2002; Bachar et al., 2008, Postow et al., 2012). Além disso, há uma tendência do melanoma da mucosa oral gerar maior envolvimento de linfonodos regionais (25%) em comparação com o melanoma da mucosa sinonasal (6%) (Patel et al., 2002).

Uma vez que os melanócitos são derivados da crista neural e migram até sua localização final durante a gestação, presume-se que as células

encontradas na mucosa do trato aerodigestivo superior são biologicamente idênticas àsquelas localizadas na pele (Owens et al., 2003). Quando comparados a outros locais do trato aerodigestivo, os melanócitos são menos frequentemente observados na mucosa oral, o que poderia explicar a menor incidência de melanomas neste local (Meleti et al., 2008).

Segundo muitos relatos, ambos os gêneros são acometidos igualmente (Stern e Guillaumondegui, 1991; Gilligan e Slevin, 1991; Shibuya et al., 1992; Manolidis e Donald, 1997; Krengli et al., 2006; Benlyazid et al., 2010), entretanto, alguns autores referem uma discreta predominância do gênero masculino (Berthelsen et al., 1984; Rapini et al., 1985; Guzzo et al., 1993; Nandapalan et al., 1998; Owens et al., 2003; Nakashima et al., 2008) e outros, o sexo feminino (Panje e Moran, 1986; Lee et al., 1994).

A média de idade ao diagnóstico varia entre 60 e 69 anos, ao passo que se sugere que o melanoma da cavidade oral ocorre em uma idade mais precoce que o da mucosa sinonasal (Conley e Pack, 1974; Harrison, 1976; Conley e Hamaker, 1977; Berthelsen et al., 1984; Panje e Moran, 1986; Gilligan e Slevin, 1991; Shibuya et al., 1992; Manolidis e Donald, 1997; Krengli et al., 2006, Meleti et al., 2008).

A radioterapia é comumente utilizada como terapia adjuvante à abordagem cirúrgica (Postow et al., 2012), uma vez que a excisão cirúrgica completa não é possível em muitos casos devido à extensão do tumor no momento do diagnóstico (Gavriel et al., 2011). O melanoma da mucosa de cabeça e pescoço tem prognóstico sombrio, com taxa de sobrevida em 5 anos variando entre 17,1% e 35,1% (Manolidis e Donald, 1997; Patel et al., 2002; Temam et al., 2005; Nakashima et al., 2008; Meleti et al., 2008) e fatores como

invasão vascular e desenvolvimento de metástases à distância estão relacionados a um prognóstico pior (Patel et al., 2002).

3.5 MELANOMA PRIMÁRIO DA MUCOSA ORAL

O melanoma primário da mucosa oral (MPMO) é um tumor muito raro e agressivo originado através das alterações malignas dos melanócitos da cavidade oral. Sua incidência abrange 0,2 a 8% de todos os melanomas e representa aproximadamente 0,5% de todas as neoplasias orais (Sharma, 2012).

Geralmente, o MPMO acomete indivíduos entre a quarta e sexta décadas de vida, sendo extremamente raro antes dos 30 anos de idade (Patrick et al., 2007; Mohan et al., 2012). Há uma discrepância na literatura acerca da predileção por gênero, e muitos autores relatam diferentes realidades. Em 2009, Águas e colaboradores referem não existir predileção; em 2007, Chidzonga e colaboradores por sua vez relatam pequena predileção pelo gênero masculino; e alguns outros autores, pelo feminino (Meleti et al., 2007; Guevara-Canales et al., 2012). Indivíduos asiáticos e negros são mais frequentemente afetados pelo MPMO que brancos, fato parcialmente atribuído à presença de maior pigmentação melânica na mucosa oral dessas raças (Águas et al., 2009).

Os locais de maior ocorrência da lesão são palato e gengiva superior, correspondendo a aproximadamente 80% dos melanomas orais (Rapidis et al., 2003; Garzino-Demo et al., 2004; Mohan et al., 2012; Mihajlovic et al., 2012).

Outras localizações incluem soalho bucal, gengiva inferior, mucosa jugal e língua (Águas et al., 2009; Garzino-Demo et al., 2004; Rapidis et al., 2003).

As características clínicas são variáveis, apresentando-se como mácula, nódulo ou massa geralmente pigmentada, associados ou não à ulceração, dor ou ao sangramento (Patel et al., 2002; Gavriel et al., 2011; Guevara-Canales et al., 2012). Tais fatores conferem uma classificação aos melanomas orais, subdividida em cinco categorias: nodular pigmentado, nodular não pigmentado, macular pigmentado, pigmentado misto, e não pigmentado misto (Tanaka et al., 1994). Outros sinais e sintomas relatados incluem desconforto gerado por próteses mal adaptadas, maior mobilidade dentária e demora na cicatrização de alvéolos após exodontia (Gavriel et al., 2011).

Clinicamente, o melanoma primário da mucosa oral pode ser confundido com outros tipos de lesões benignas em algumas circunstâncias, como se observa no quadro de melanose na cavidade oral, um acometimento extremamente comum principalmente em indivíduos negros. Geralmente se desenvolve na gengiva inserida e pode ser diferenciado de uma lesão maligna devido à simetria ou bilateralidade. Entretanto, a melanose também pode surgir como única área pigmentada e, nestas situações, a biopsia é indicada. Por sua vez, o nevo oral, embora incomum, apresenta características clínicas semelhantes ao melanoma que dificultam sua distinção. Pacientes com determinadas doenças, como por exemplo a Síndrome de Peutz-Jeghers, também podem exibir lesões pigmentadas na mucosa oral. Assim, para se obter uma adequada avaliação e correta diagnose, a realização de biopsia se faz necessária em todos estes casos (Balch et al., 2009). Particularmente, a melanose oral tem sido relacionada como uma lesão precursora do melanoma

oral; entretanto, existe uma contraversa relação entre esta apresentação e a necessidade de excisão profilática ou mesmo de acompanhamento próximo destes pacientes (Takagi et al., 1974; Buchner e Hansen, 1980; Temam et al., 2005).

O melanoma primário da mucosa oral tem um prognóstico ruim, apresentando comportamento mais agressivo que os melanomas da pele. A vascularização abundante da cavidade oral permite a invasão de vasos sanguíneos e disseminação via hematogênica, tendendo a metastatizar ou invadir localmente os tecidos adjacentes mais facilmente que outros tumores (Prasad et al., 2002; Lengyel et al., 2003; Garzino-Demo et al., 2004; Sharma, 2012). A presença de metástase à distância no momento do diagnóstico é relativamente incomum (4 a 10% dos casos) (Gavriel et al., 2011). Os locais mais comuns de metástases são linfonodos, fígado, pulmão, cérebro e osso, com acometimento generalizado em casos avançados (Garzino-Demo et al., 2004; Sharma, 2012). A presença de metástase linfonodal pode ser detectada em aproximadamente de 25% dos casos no momento do diagnóstico (Patel et al., 2002; Krengli et al., 2006 e Nakashima et al., 2008). Supostamente, o fator prognóstico mais significativo para essas lesões é o estadió clínico, definido como tumores localizados (Estadió I, TqualquerN0M0), tumores metastáticos para linfonodos regionais (Estadió II, TqualquerN1M0) e tumores metastáticos para locais distantes (Estadió III TqualquerNqualquerM1) (Patel et al., 2002; Prasad et al., 2004).

Histologicamente, o MPMO exibe uma ampla variedade morfológica, incluindo células fusiformes e epitelioides que podem apresentar-se dispostas em lençóis, arranjos organoides, alveolar, neurotrópico e desmoplásico,

possuindo também um considerável pleomorfismo, com núcleos grandes, irregulares, hipercromáticos, angulosos e nucléolos proeminentes, tendo atividade mitótica facilmente detectável e presença de pigmento de melanina em aproximadamente 90% das lesões (Smoller et al., 2006; Sharma, 2012). A regressão, uma resposta parcial do hospedeiro que resulta em uma diminuição focal do processo, pode estar presente em muitos melanomas invasivos, apresentando histologicamente alterações semelhantes às de uma cicatriz, notando-se um infiltrado de linfócitos junto a histiócitos e macrófagos pigmentados localizados abaixo de uma mucosa atrofiada sem prolongamentos epiteliais (Smoller et al., 2006; Sharma, 2012).

A presença de células ricas em melanina no exame histológico normalmente é de fácil identificação. Entretanto, como aproximadamente 13-25% dos melanomas mucosos são amelanóticos e fazem diagnóstico diferencial com carcinoma epidermoide pouco diferenciado, linfomas e sarcomas, a análise imunoistoquímica para a detecção de proteínas específicas dos melanócitos é de extrema importância na diferenciação dessas entidades. Para isso, é importante se fazer a investigação com marcadores para S-100, vimentina, HMB-45, Melan-A e tirosinase, uma vez que todos os melanomas são reativos para tais anticorpos (Batsakis et al., 1982; Krengli et al., 2006; Bachar et al., 2008, Gavriel et al, 2011).

O melanoma primário da mucosa oral pode ser classificado de acordo com as características morfológicas celulares em (Prasad et al., 2002):

1. **Monomorfo:** caracteriza-se pela homogeneidade celular, sendo predominantemente fusiforme ou epiteloide, com pelo menos 75% das células tumorais com características semelhantes.

2. **Polimorfo:** caracteriza-se pela heterogeneidade celular, em que apresenta uma população mista de células de melanoma, variando consideravelmente em tamanho e forma. Estes tumores são compostos tanto por células fusiformes quanto por células epitelioides, cada uma correspondendo a mais de 25% do tumor. Tumores polimorfos muitas vezes contêm células multinucleadas e/ou células com núcleos grandes hipercromáticos. A presença destas células não é necessária para a classificação como polimorfo, mas contribui para a heterogeneidade fenotípica do tumor.

Os parâmetros histopatológicos utilizados para o estadiamento tradicional de melanomas cutâneos (classificação de Breslow e classificação de Clark) não podem ser aplicados à mucosa oral devido à falta de pontos de referência análogos à derme papilar e reticular (Prasad et al., 2004). Portanto, a profundidade de invasão tem sido definida em 3 categorias (Prasad et al., 2004; Sharma, 2012):

Nível I: melanoma “*in situ*” sem invasão ou microinvasivo;

Nível II: melanoma com invasão até a lâmina própria;

Nível III: invasão de estruturas profundas como o osso, cartilagem ou músculo esquelético.

Os diferentes níveis representam compartimentos microanatômicos distintos separados por barreiras de tecido que são facilmente identificáveis em microscopia de luz. Dessa forma, o nível I se apresenta predominantemente acima da membrana basal epitelial; o nível II está abaixo da membrana basal epitelial, mas acima do perímio, periosteio, ou pericôndrio; e o nível III é a invasão através do perímio, periosteio ou pericôndrio (Prasad et al., 2004).

O tratamento do MPMO ainda é controverso. Basicamente, a excisão da lesão primária envolvendo uma margem de pelo menos 1,5 cm de tecido saudável é recomendada. O esvaziamento cervical tem indicação para casos com presença confirmada no pré-operatório de metástases em linfonodos, e a escolha da modalidade de esvaziamento deve ser guiada pela extensão e o nível destes linfonodos (Sharma, 2012). A cirurgia pode ser combinada com outras modalidades terapêuticas, como a radioterapia, quimioterapia, ou imunoterapia, embora sua eficácia seja praticamente desconhecida (Rapidis et al., 2003; Sharma, 2012). A radioterapia pós-operatória é geralmente recomendada se características patológicas de mau prognóstico estão presentes, tais como múltiplos linfonodos positivos ou disseminação do melanoma metastatizado extranodal, mesmo que os MPMOs sejam considerados como pouco radiosensíveis (Sharma, 2012).

O prognóstico dos doentes com melanomas orais é sombrio com apenas 5 anos de sobrevida estimados em 5 a 20% dos doentes, enquanto que para os melanomas orais a média se encontra em torno de 2 anos a partir do diagnóstico (Chidzonga et al., 2007). Tais estimativas dependem diretamente do envolvimento linfonodal ou não, em uma variação de 18 a 46 meses (Rapidis et al., 2003). Em geral, os fatores prognósticos para uma pior sobrevida incluem localização do tumor primário, estágio no momento do diagnóstico, espessura tumoral maior que 5mm, presença ou ausência de invasão vascular e desenvolvimento de metástases em linfonodos ou à distância (Patel et al., 2002; Gu et al., 2003; Garzino-Demo et al., 2004; Mendenhall et al., 2005).

Alguns mecanismos envolvidos na patogenia dos melanomas cutâneos já estão bem estabelecidos na literatura, sendo um deles as alterações nos padrões de expressão de moléculas de adesão, tais como integrinas e imunoglobulinas (Haass et al., 2005). Entretanto, a participação destas moléculas na patogenia do melanoma da mucosa oral ainda não está bem estabelecida.

3.6 MOLÉCULAS DE ADESÃO

As moléculas de adesão são glicoproteínas expressas na superfície celular que são capazes de promover ligações entre si – interação homofílica; com outras moléculas – interação heterofílica; ou ambas. Adicionalmente, elas podem mediar adesões entre duas células do mesmo tipo, chamadas homotípicas, ou entre diferentes tipos celulares, conhecidas como heterotípicas (Nesbit e Herlyn, 1994; McGary et al., 2002).

A desregulação da expressão dessas moléculas de adesão e de comunicações celulares pode ser desencadeada através de alterações no equilíbrio homeostático existente entre os melanócitos e os queratinócitos da pele, contribuindo para a proliferação descontrolada dos melanócitos e consequentemente para a formação de neoplasias malignas (Haass et al., 2004; Haass et al., 2005). Por sua vez, a homeostase determina se as células permanecem quiescentes, proliferam-se, diferenciam-se ou sofrem apoptose. Assim, em condições fisiológicas, os melanócitos e os queratinócitos da pele formam um complexo denominado “unidade epidérmica de melanização”, em

que o equilíbrio entre essas células é mantido por meio da indução regulada da divisão de melanócitos. Durante esse processo, os melanócitos se desligam dos queratinócitos, retraem os seus processos dendríticos, dividem-se e migram pela membrana basal até finalmente se re-integrarem aos queratinócitos (Haass e Herlyn, 2005). Tal controle da proliferação dos melanócitos em torno dos queratinócitos ocorre por meio de diferentes vias:

- comunicação extracelular por meio de fatores de crescimento parácrinos;
- comunicação intracelular via transdução de sinais e mensageiros secundários;
- comunicação intercelular por meio de moléculas de adesão intercelulares e célula-matriz extracelular (Haass et al., 2004).

No estado de homeostase, os queratinócitos controlam o crescimento e comportamento dos melanócitos através de um sistema complexo de fatores de crescimento parácrinos e moléculas de adesão celular. O mecanismo inicial de formação dos melanomas tem sido estudado em melanomas cutâneos, mas não há estudos similares destes processos em melanomas mucosos, cujas características diferem dos melanomas da pele.

A atividade sinalizadora das moléculas de adesão celular, tais como imunoglobulinas e integrinas, tem sido considerada uma consequência direta das suas propriedades adesivas. Entretanto, processos fisiológicos e patológicos como clivagem, alterações conformacionais e mutações reduzem ou mesmo anulam as propriedades adesivas destas moléculas. Em alguns casos, apesar da sua adesão deficiente, as propriedades sinalizadoras estão mantidas através dos seus domínios citoplasmáticos e/ou domínio extracelular

mutado ou encurtado em alguns casos. A capacidade das moléculas de adesão em ativar cascatas de transdução de sinal na ausência de adesão celular aumenta significativamente suas atividades biológicas (Cavallaro e Dejana, 2011).

Os mecanismos exatos envolvidos no desenvolvimento dos melanomas ainda não estão bem estabelecidos na literatura, entretanto a alteração de alguns fatores já é bem conhecida na pele: 1) diminuição de receptores importantes para a comunicação e adesão aos queratinócitos; 2) aumento de receptores e moléculas de adesão ausentes em melanócitos normais; 3) perda da ancoragem à membrana basal devido a alterações na expressão de moléculas de adesão envolvidas nesse processo (Hanahan e Weinberg, 2000; Park et al., 2000; Haass et al., 2005). Baseando-se nesses fundamentos biológicos, é imprescindível que mais estudos acerca da atuação das moléculas de adesão em melanoma de mucosa oral sejam realizados, a fim de contribuir com novas pesquisas na área possivelmente capazes de gerar subsídios de tratamento e prevenção.

3.6.1 INTEGRINAS

As integrinas são moléculas de adesão transmembrânicas compostas por subunidades alfa e beta, membros de uma família de glicoproteína, que formam receptores heterodiméricos para moléculas da matriz extracelular. Dezoito subunidades alfa e oito subunidades beta são pareadas de forma a gerar vinte e quatro integrinas diferentes, determinando um ligante específico e permitindo uma amplo espectro de interações célula-célula e célula-matriz (McGary et al, 2002). Geralmente, as subunidades alfa e beta-integrina estão ligadas umas as outras de forma não-covalente. Cada subunidade tem um domínio maior extracelular, um domínio único transmembrânico e um domínio curto citoplasmático não-catalítico – exceto a subunidade beta-4, cujo domínio citoplasmático é extremamente grande (Rathinam e Alahari, 2010). Essas duas subunidades são essenciais para que ocorra sua expressão na superfície celular (Longhurst e Jennings, 1998).

Em 1987, Hynes e colaboradores introduziram o termo integrina para descrever essa família de proteínas transmembrânicas, que participam da adesão célula-célula e célula-matriz extracelular em diversos processos fisiológicos importantes, incluindo o desenvolvimento embrionário, hemostasia, trombose, mecanismos de defesa imune e não imune e transformação oncogênica. Além disso, influenciam a regulação da morfologia celular, transcrição do gene e migração celular (Rathinam e Alahari, 2010).

A ativação das integrinas ocorre através de um processo conhecido sinalização “inside-out” e “outside-in”, em que os sinais para o agrupamento de

receptores e alterações conformacionais são desencadeados por outros receptores da mesma célula (Hynes, 1992; Johnson et al., 1999; Hynes, 2002; McGary et al., 2002). No mecanismo “outside-in”, um ligante associa-se ao domínio extracelular da integrina, ocorrendo uma alteração conformacional, de modo que um sinal é transmitido para dentro da célula, e envolve a regulação de diversos processos celulares fundamentais. A sinalização “inside-out” se origina de receptores da superfície celular não-integrina ou moléculas citoplasmáticas e ativa vias de sinalização intracelular, resultando na ativação/desativação das integrinas. Neste caso, a adesão pode ser regulada tanto por alteração conformacional quanto por mudança de valência. Entretanto, apesar da divisão em duas entidades distintas de sinalização, elas podem ocorrer simultaneamente (Clark e Brugge, 1995; Jones e Walker, 1999).

As integrinas se ligam a numerosas proteínas do citoesqueleto, como a alfa actina, talina e filamina, e também a moléculas da matriz extracelular, como colágeno, laminina, fibronectina, dentre outras (Hynes, 1992; Hemler, 1998; Gahmberg et al., 2009). Cada interação é específica e, portanto, para cada ligante diferente, uma via de sinalização distinta é ativada (Heino, 2000). Quando entram em contato com os seus ligantes, as integrinas se movem lateralmente formando grupos na membrana citoplasmática, denominados adesões focais, onde sua porção citoplasmática mantém contato com o citoesqueleto, formando um canal de comunicação entre os meios intra e extracelular, podendo ativar ou desativar vias de sinalização que influenciam o comportamento celular (Longhurst e Jennings, 1998; Gahmberg et al., 2009). Além disso, elas também interagem com receptores de fatores de crescimento, como o EGF (fator de crescimento epitelial), VEGF (fator de crescimento

vascular endotelial), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), entre outros, resultando no aumento da fosforilação destes receptores e ativação de vias de sinalização (Boudreau e Jones, 1999).

Excelentes artigos mostram a participação das integrinas em importantes funções no crescimento neoplásico, migração e disseminação de células tumorais e processos de metástase (Hynes, 2002; Haass et al., 2005; Kuphal et al., 2005). De fato, o melanoma é considerado um modelo biológico para o estudo dessa família de moléculas e alterações na sua expressão vem há muito tempo sendo relacionadas com a progressão dos melanomas (Moretti et al., 1993).

Em especial, a integrina alfa-v beta-3 tem importância ímpar no desenvolvimento do melanoma. Essa molécula, em geral superexpressa nos melanomas, desencadeia a ativação de uma série de fatores de crescimento que estimulam a progressão neoplásica (Bachman et al., 2008), e tem sido alvo de pesquisas para aplicação em quimioterápicos, o que evidencia a importância da pesquisa laboratorial no âmbito terapêutico (Petitclerc et al., 1999). Outras subunidades de integrinas também parecem estar diretamente envolvidas nos mecanismos de metástase do melanoma cutâneo, especialmente aquelas compostas pela integrina beta1 (Haass et al., 2005).

3.6.2 IMUNOGLOBULINAS

As imunoglobulinas são glicoproteínas da superfície celular que expressam um número variável de “*loops*” no seu domínio extracelular. A

maioria destas moléculas possui um domínio transmembrânico, mas estão ligadas à superfície celular somente por uma âncora glicofosfatidil inositol (Cavallaro e Dejana, 2011). Interações heterofílicas com membros da superfamília das imunoglobulinas, integrinas, caderinas e componentes da matriz extracelular podem ocorrer, assim como interações homofílicas, que são fundamentais na adesão celular Ca^{+2} dependentes (Aricescu e Jones, 2007; Maness e Schachner, 2007).

A família de imunoglobulinas apresenta uma importante relevância na fisiopatologia do melanoma, dentre as quais se podem destacar o CD54 (ICAM), CD66 (CEACAM), CD146 (MCAM ou Mel-CAM) e CD166 (ALCAM). Estas moléculas parecem ser importantes na progressão do melanoma, embora muitas de suas funções ainda estejam incertas. Através da revisão da literatura, é possível notar sua participação em casos avançados de melanoma e em doenças metastáticas (Thies et al., 2002; Haass et al., 2005).

Particularmente, o CD54 (ICAM) está relacionado com a progressão do melanoma e o risco de metástase (Johnson et al., 1989). Sua expressão é mais evidente no melanoma quando comparado a nevos e aumenta conforme o índice de Breslow em melanomas primários (Natali et al., 1990, Natali et al., 1997; Schadendorf et al., 1993, Schadendorf et al., 1995). Já o CD66 (CEACAM) se trata de uma molécula glicoproteica de superfície pertencente à superfamília das imunoglobulinas e está envolvidas na adesão intercelular. Associa-se a diversas funções celulares que regulam o crescimento e diferenciação e tem papel importante na homeostase da insulina, vasculogênese e imunomodulação. Além disso, implica-se em diversos processos intracelulares mediadas por sinalização envolvidas no crescimento e

diferenciação de células tumorais, desempenhando, desta forma, um papel fundamental na modulação de numerosos tipos de câncer. Em 2002, Thies e colaboradores observaram uma forte correlação entre a expressão desta molécula em tumores primários e o desenvolvimento subsequente de doença metastática. Poucos anos depois, em 2009, Gambichler e colaboradores observaram um aumento aparentemente gradual da expressão de CD66 em lesões melanocíticas cutâneas em estágios mais avançados da progressão neoplásica, o que indica que CD66 pode ter um papel importante no desenvolvimento e progressão do melanoma cutâneo. Adicionalmente, na interface entre células/ matriz extracelular, essa molécula interage com as integrinas (especialmente com a subunidade beta-3) e essa interação parece ser importante na migração celular e metástase (Brümmer et al., 2001).

A molécula CD146 foi primeiramente identificada como uma molécula de adesão celular específica do melanoma, sendo capaz de proporcionar interações homólogas e heterólogas entre melanócitos neoplásicos e células endoteliais em via independente do cálcio (Johnson et al., 1999). Também conhecida como MELCAM, MCAM e MUC18 (Liu et al., 2012), CD146 desempenha um papel fundamental pró-migratório no sistema vascular, desenvolvimento normal e progressão tumoral, exibindo superexpressão em muitos tumores, incluindo melanoma, câncer de próstata e câncer de mama (Kristiansen et al., 2003; Aldovini et al., 2006; Zabouo et al., 2009). A expressão de CD146 nos melanócitos, nevos e células de melanoma em fase de crescimento radial é ambientalmente regulada através do contato direto célula-célula com os queratinócitos, mas os mecanismos desta regulação não estão bem estabelecidos (Li e Herlyn, 2002). Além disso, na progressão do

melanoma, a expressão dessa molécula aumenta gradualmente e atinge seu pico na doença metastática (Shih et al., 1994; Johnson et al., 1996; Johnson et al., 1997; Haass et al., 2005). Relata-se ainda que o CD146 exhibe estrita relação com as caderinas E e N e, em situações experimentais onde o aumento da expressão das caderinas é estimulado, seus níveis retornam aos índices normais (Hsu et al., 2000).

O CD166, também chamado de ALCAM, foi inicialmente identificado em leucócitos ativados, células-tronco hematopoiéticas e progenitores mieloides. Além disso, é possível observar sua expressividade em células neuronais, células-tronco mesenquimais, células do estroma da medula óssea, e também em cultura de células metastáticas de melanoma (Weidle et al., 2010). Assim como outras moléculas de adesão, o CD 166 apresenta interações homofílicas e heterofílicas, e tem representado um marcador do desenvolvimento metastático similarmente à integrina beta-3, uma vez que sua expressão atinge níveis máximos em células metastáticas de melanoma (Van Kempen et al., 2004).

Dada a evidência de participação das moléculas de adesão em mecanismos biológicos que regem a evolução do melanoma cutâneo e considerando-se a pouca informação a respeito desses mecanismos no melanoma primário das mucosas, este estudo sedimenta uma linha de investigação para compreender esses fenômenos tendo como modelo o melanoma da mucosa oral.

4.CASUÍSTICA,MATERIAIS E MÉTODOS

4. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras

Ao total, foram selecionados 35 casos de melanomas primários da mucosa oral pertencentes aos arquivos da Disciplina de Patologia Geral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, dos Departamentos de Dermatologia e de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center e do Hospital Obrero de La Paz, Bolívia.

4.2. Critérios de Inclusão

Casos com diagnóstico de melanoma primário da mucosa oral, confirmados de acordo com informações dos prontuários associadas aos laudos de exames de imagens.

4.3. Critérios de Exclusão

Blocos com material insuficiente ou área não representativa do tumor.

4.4 Coleta de Dados Clínicos

Dados relevantes a este estudo relacionados aos pacientes foram analisados: idade, sexo, raça e a história clínica da doença (localização da lesão, e, quando possível, modalidade de tratamento).

4.5 Análise morfológica dos melanomas

Cortes histológicos dos tumores corados pela técnica da hematoxilina e eosina (H/E) foram analisados para o estudo morfológico dos padrões arquiteturais e celulares dos casos incluídos no estudo. Todos os casos encontrados no arquivo que se enquadravam nos critérios de inclusão foram estudados, independentemente de seus padrões morfológicos ou extensão/profundidade, devido à raridade da lesão e a existência de poucos casos disponíveis para o estudo.

4.6 Confecção do “Tissue Microarray”

A confecção do TMA foi realizada através do aparelho *tissue microarrayer* (Beecher Instruments®, Silver Spring, EUA). Duas áreas previamente selecionadas foram puncionadas do bloco doador em locais diferentes com uma agulha de 1mm, e os cilindros obtidos foram transferidos para o bloco receptor. Foram incluídos 34 casos representados por 53 amostras em duplicata, totalizando 106 amostras no TMA de melanomas primários da mucosa oral. Particularmente, o trigésimo quinto caso foi obtido após a

confeção do TMA, portanto, as reações de imunoistoquímica neste caso foram realizadas separadamente.

4.7 Análise Imunoistoquímica do “Tissue Microarray” de Melanoma

Cortes seriados de 4 μ m de cada TMA foram utilizados para a análise imunoistoquímica das moléculas de adesão do material contido nos TMAs, cujo processamento foi realizado por meio da técnica da fosfatase alcalina. O protocolo se inicia com a desparafinização dos cortes em dois banhos de xilol: o primeiro a 60°C por 30 minutos, e o segundo à temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanol (100%, 95%, 85%, respectivamente) e imersos em solução de hidróxido de amônia a 10% durante 10 minutos para a remoção de pigmentos formólicos.

Quando necessária, a recuperação dos sítios antigênicos foi utilizada e está discriminada na Tabela 1. Procedeu-se então a lavagem em água corrente e água destilada, seguida da incubação do material em solução de peróxido de hidrogênio a 3% com o intuito de bloquear a peroxidase endógena tecidual.

Repetida a lavagem com água corrente e água destilada, os cortes foram imersos duas vezes em solução de TRIS pH 7,4 por dois minutos cada. Em seguida, os cortes foram incubados com solução de 1% BSA (Sigma), 5% SFB (Cultilab) em TRIS pH 7,4 por 60 minutos, a fim de se bloquear reações do soro primário com proteínas inespecíficas teciduais. Em seguida, os cortes foram incubados com o soro primário diluído em solução de 1% BSA (Sigma) em TRIS pH 7,4. Informações sobre os anticorpos e etapas específicas do protocolo estão descritas na Tabela 1.

Os procedimentos posteriores foram sempre precedidos de duas lavagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS pH 7,4 durante 5 minutos cada. Os espécimes foram então incubados com o reagente En Vision fosfatase alcalina (Dako Cytomation) por 30min.

Posteriormente, os espécimes foram incubados com o revelador permanente “Permanent Red” (Dako Cytomation), por 3 a 20 minutos, com o qual se evidencia a reação por meio de coloração avermelhada. Os cortes foram então lavados em tampão TRIS pH 7,4 água corrente e água destilada e contra-corados com hematoxilina de Carazzi por 10 minutos.

Finalmente, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis, diafinizados em três banhos de xilol, e montados em resina *permount* para o exame ao microscópio de luz. Os controles negativos das reações supracitadas foram realizados através da incubação de espécimes com solução tampão substituindo o anticorpo primário.

Todas as reações foram realizadas em triplicatas e observadas em microscópio óptico, sendo fotografadas com equipamento fotográfico digital acoplado e analisando-se os dados de forma qualitativa e semi-quantitativa.

Tabela 1: Anticorpos, clones, procedência e detalhes do protocolo

SORO PRIMÁRIO	PROCEDÊNCIA E CLONE	TÍTULO	CONTROLE POSITIVO	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA
Integrina alfa-2	Chemicon 10G11	1:30	Pele Normal	Pepsina 1%, 37°C, 30 minutos
Integrina alfa-3	Chemicon P1B5	1:30	Pele Normal	Pepsina 1%, 37°C, 30 minutos
Integrina alfa-4	Chemicon P1H4	1:50	Pele Normal	Pepsina 1%, 37°C, 30 minutos
Integrina alfa-5	Chemicon P1D6	1:30	Pele Normal	Pepsina 1%, 37°C, 30 minutos
Integrina alfa-6	Chemicon NKI-G0H3	1:30	Pele Normal	Pepsina 1%, 37°C, 30 minutos
Integrina alfa-v	Chemicon VNR147	1:50	Pele Normal	Pepsina 1%, 37°C, 30 minutos
Integrina beta-1	Chemicon P4G11	1:50	Pele Normal	Pepsina 1%, 37°C, 30 minutos
Integrina beta-3	Chemicon SAP	1:30	Pele Normal	Pepsina 1%, 37°C, 30 minutos
Integrina beta-4	Chemicon ASC-3	1:50	Pele Normal	Pepsina 1%, 37°C, 30 minutos
ICAM/ CD54	Vector 23G12	1:50	Pele Normal	Citrato pH 6,0
CEACAM/ CD66	Vector 29H2	1:50	Pele Normal	Citrato pH 6,0
MELCAM/ CD146	Vector N1238	1:50	Pele Normal	Citrato pH 6,0
ALCAM/CD166	Vector MOG/07	1:50	Pele Normal	Citrato pH 6,0

4.8 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos na análise semi-quantitativa dos marcadores utilizados no estudo foram correlacionados com os aspectos clínicos e histopatológicos dos tumores incluídos no TMA.

A análise de associação entre os marcadores protéicos e aspectos clínicos e histopatológicos foi realizada utilizando-se o teste de qui-quadrado e o teste exato de Fisher. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com $p > 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SPSS, versão 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

5.RESULTADOS

5.RESULTADOS

5.1 Resultados clínicos

Dentre os casos incluídos no estudo, 17 indivíduos eram do gênero feminino (48,75%) e 18 do masculino (51,43%) (Figura 1). Observou-se uma maior prevalência da lesão em pacientes leucodermas, representando 23 casos (65,72%), em relação aos não-brancos, apresentando apenas 6 melanodermas e 2 xantodermas (22,85%) (Figura 2). Os 4 pacientes restantes não exibiram detalhamento de raça no prontuário. Quanto à idade, a média de diagnóstico foi definida aos 61 anos, variando dentre 9 e 91 anos. A maioria dos casos acometia o palato (71,42%) (Figura 3), e em 60% dos casos observou-se a ocorrência de metástase, sendo o cérebro, o fígado e os pulmões os locais mais envolvidos. Todos os dados clínicos estão descritos na Tabela 2 e representados nas Figuras 1, 2 e 3, enquanto os aspectos clínicos e macroscópicos do melanoma oral estão ilustrados na Figura 4.

Figura 1: Representação gráfica da distribuição do melanoma primário da mucosa oral segundo o gênero

Figura 2: Representação gráfica da distribuição do melanoma primário da mucosa oral segundo o grupo étnico

Figura 3: Representação gráfica da distribuição do melanoma primário da mucosa oral segundo a distribuição anatômica

Tabela 2: Dados clínico-demográficos dos melanomas primários da mucosa oral

	Sexo, idade	Raça etnia	Localização	Recorrência local	Tratamento	Metástase
1	F, 59	B	Palato duro, rebordo	Palato duro, rebordo	Crioterapia	Linfonodos cervicais e pulmões
2	M, 56	N	Rebordo alveolar inferior	Não	Cirurgia	Parótida e pulmões
3	F, 37	B	Borda lateral da lingual	Não	Quimioterapia	Pulmões
4	M, 51	B	Sulco vestibular superior	Não	Quimioterapia	Pulmões
5	M, 57	B	Palato duro, rebordo	Pele	Cirurgia + quimioterapia	Linfonodos submandibulares e pulmões
6	F, 63	O	Palato duro	Não	Cirurgia + quimioterapia	Linfonodos cervicais e pulmões
7	F, 36	B	Palato duro e rebordo	palato	Cirurgia + quimioterapia	Linfonodos cervicais
8	M, 60	N	Palato duro, mole e assoalho	Mucosa oral	Cirurgia + radioterapia	NI
9	F, 61	B	Palato duro e rebordo	Palato duro	Cirurgia	Linfonodos cervicais e pulmões
10	F, 59	B	Palato duro e rebordo	Não	Cirurgia + radioterapia	Linfonofos cervicais e submandibulares
11	M, 66	B	Palato duro e rebordo	Não	Cirurgia + quimioterapia	Linfonodos cervicais e cérebro
12	F, NI	B	Lábio superior e sulco vestibular	Rebordo alveolar	NI	NI
13	M, 69	B	Palato duro e rebordo	Não	Cirurgia	Linfonodos cervicais e pulmões
14	F, 73	B	Palato duro e rebordo	Não	Cirurgia	Linfonodos submentonianos e pulmões
15	F, 87	B	Palato duro, rebordo e mucosa jugal	Não	Cirurgia	Linfonodos submentonianos e pulmões
16	F, 56	B	Mandíbula	NI	NI	Linfonodos cervicais e fossa temporal
17	M, 51	B	Palato duro	Não	Cirurgia + quimioterapia	Linfonofos cervicais
18	M, 61	N	Soalho, mucosa jugal, borda lateral da lingual, palato mole	Não	Cirurgia	Linfonodos cervicais
19	M, 57	B	Palato duro, rebordo	Não	Cirurgia + radioterapia	Não
20	M, 78	B	Palato duro, rebordo, mucosa jugal	Mucosa oral	Cirurgia + quimioterapia	Linfonodos cervicais e pulmões
21	M, 91	NI	Palato duro	NI	NI	NI
22	F, 46	N	Rebordo inferior, mucosa labial	Não	Cirurgia	NI
23	F, 65	B	Palato duro, mucosa vestibular	Palato duro	Cirurgia	Linfonodos cervicais
24	M, 67	O	Palato duro	NI	NI	NI
25	M, 9	N	Palato duro	Palato duro	NI	Linfonodos cervicais
26	M, 87	B	Trígono e palato mole	NI	NI	Linfonodos cervicais
27	M, 47	B	Palato duro	NI	NI	NI
28	F, 51	B	Palato duro	NI	NI	NI
29	F, 46	B	Rebordo superior	NI	NI	NI
30	F, 49	NI	NI	NI	NI	NI
31	M, 63	NI	Mucosa labial	NI	NI	NI
32	F, 71	NI	Palato duro	NI	NI	NI
33	F, 83	B	Palato duro, rebordo	Palato duro	Crioterapia	Não
34	M, 88	B	Palato duro	Não	Crioterapia	Linfonodos cervicais
35	M, 78	N	Palato duro	Não	Nenhuma	Não

B: branca; F: feminino; M: masculino; N: negra; NI: não informado; O: oriental

Figura 4: Aspectos clínicos e macroscópicos do melanoma oral

Legendas da Figura 4: Aspectos clínicos e macroscópicos do melanoma oral

A: Melanoma melanótico em palato duro e gengiva – lesão acastanhada ulcerada e irregular.

B: Melanoma melanótico em palato duro – lesão enegrecida multifocal, de bordas irregulares e com ulceração central.

C: Melanoma melanótico em gengiva e mucosa vestibular – lesão enegrecida, de bordas irregulares com história de longa duração.

D: Produto de exérese de melanoma na maxila. Notar a coloração negra do espécime.

5.2 Resultados morfológicos

A análise histopatológica dos 35 casos de melanoma primário oral revelou majoritariamente um diagnóstico com um nível de invasão III (28 casos - 80%). Por outro lado, o nível II de invasão tumoral foi observada apenas em 5 tumores (14,28%) e a profundidade da invasão não pôde ser avaliada em um caso. Trinta e quatro tumores eram pigmentados, e 1 caso era amelanótico. Os tumores exibiam graus variados de pleomorfismo celular e arquitetural. Quanto à composição celular, 18 (51,43%) eram monomorfos e 17 (48,57%) eram polimorfos. Aspectos necróticos foram encontrados em 16 casos (45,71%), ilustrando variação focal e extensa, enquanto embolização vascular foi observada em 20 dos 35 casos (57,14%), e invasão perineural em 9 (25,71%). Os dados clínicos relevantes ao estudo estão descritos na Tabela 3, ao passo que a Tabela 4 representa os dados histopatológicos, cujos níveis podem ser observados na Figura 5 e cujos aspectos estão ilustrados nas Figuras 6, 7 e 8.

Tabela 3: Localização, nível histológico* e medidas máximas dos melanomas orais incluídos no TMA (*Segundo Prasad et al., 2004)

Caso	Tumor primário	Nível histológico*	Medida (mm)
1	Palato duro, rebordo alveolar esquerdo	III	4,2
2	Rebordo alveolar inferior direito	III	NA
3	Borda lateral esquerda da lingual	NA	NA
4	Sulco gengivo-jugal superior direito	II	0,8
5	Palato e rebordo alveolar superior esquerdo	III	1,9
6	Palato duro	III	3,0
7	Rebordo alveolar superior esquerdo e palato duro	III	6,7
8	Palato, rebordo alveolar superior direito, limite superior da região amigdaliana esquerda, assoalho bucal	III	2,6
9	Palato e rebordo alveolar direito	III	5,5
10	Rebordo alveolar superior direito, hemipalato duro direito, fundo de sulco gengivo-jugal superior direito	III	3,4
11	Palato duro e gengiva superior	III	3,4
12	Rebordo alveolar superior, palato duro, sulco gengivo-labial	III	3,3
13	Palato duro e gengiva superior	III	5,4
14	Rebordo alveolar superior, palato duro, sulco gengivo-labial	III	3,4
15	Palato duro, rebordo alveolar superior anterior, fundo de sulco superior até região jugal	II	0,5
16	Mandíbula	III	NA
17	Palato duro	III	12,6
18	Assoalho bucal, rebordo alveolar inferior esquerdo, borda lateral esquerda da língua, palato duro, palato mole e rebordo alveolar anterior	III	8,4
19	Palato duro, rebordo alveolar superior	III	7,0
20	Mucosa jugal direita, rebordo alveolar superior direito e palato duro à direita	III	4,9
21	Palato	III	11,0
22	Rebordo alveolar inferior e mucosa jugal	II	0,9
23	Palato duro e mucosa jugal	III	14,5
24	Palato	III	NA
25	Palato duro	III	4,8
26	Rebordo alveolar inferior e trígono retromolar	III	12,5
27	Palato duro	III	NA
28	Palato	II	1,0
29	Rebordo alveolar superior direito	III	4,5
30	Não informado	III	4,0
31	Mucosal labial	III	4,6
32	Palato	II	1,8
33	Palato e rebordo alveolar superior	III	3,5
34	Palato duro à direita	III	3,5
35	Palato duro à direita e rebordo alveolar à direita	I	<i>In situ</i>

NA: não avaliável

Tabela 4: Detalhes histopatológicos dos melanomas primários da mucosa oral

Caso	Arquitetura	Melanina	Invasão vascular/neural	Necrose	Regressão	Angiogênese
1	Monomorfo	Ausente	Presente/ausente	Ausente	Ausente	Presente
2	Polimorfo	Presente	Presente/ausente	Presente (E)	Ausente	Presente
3	Monomorfo	Escassa	Na	Presente (E)	Na	Na
4	Polimorfo	Presente	Ausente/ausente	Ausente	Ausente	Presente
5	Polimorfo	Intensa	Presente/presente	Presente	Ausente	Escassa
6	Monomorfo	Presente	Ausente/ausente	Presente (E)	Presente (F)	Presente
7	Polimorfo	Escassa	Presente/presente	Presente (E)	Ausente	Presente
8	Monomorfo	Presente	Ausente/ausente	Ausente	Ausente	Presente
9	Polimorfo	Presente	Presente/presente	Ausente	Ausente	Presente
10	Monomorfo	Intensa	Presente/ausente	Ausente	Ausente	Presente
11	Monomorfo	Intensa	Presente/ausente	Ausente	Ausente	Presente
12	Polimorfo	Escassa	Ausente/ausente	Presente	Ausente	Presente
13	Polimorfo	Escassa	Presente/ausente	Presente	Ausente	Presente
14	Polimorfo	Intensa	Presente/presente	Presente	Ausente	Presente
15	Monomorfo	Intensa	Ausente/ausente	Ausente	Ausente	Presente (I)
16	Monomorfo	Focal	Presente/ausente	Ausente	Na	Presente
17	Polimorfo	Intensa	Presente/presente	Presente	Ausente	Presente
18	Polimorfo	Intensa	Presente/ausente	Presente	Ausente	Presente
19	Monomorfo	Intensa	Presente/presente	Ausente	Ausente	Ausente
20	Polimorfo	Presente	Presente/ausente	Ausente	Presente	Presente (I)
21	Polimorfo	Escassa	Presente*/ausente	Presente	Ausente	Presente (I)
22	Monomorfo	Intensa	Presente/presente	Ausente	Ausente	Presente (I)
23	Polimorfo	Presente	Ausente/ausente	Presente	Ausente	Presente (I)
24	Monomorfo	Ausente	Presente/ausente	Ausente	Na	Presente
25	Polimorfo	Escassa	Ausente/ausente	Ausente	Ausente	Presente (D)
26	Polimorfo	Escassa	Ausente/ausente	Ausente	Ausente	Presente (I)
27	Monomorfo	Presente	Ausente/ausente	Ausente	Ausente	Presente (I)
28	Monomorfo	Presente	Ausente/ausente	Ausente	Ausente	Presente (I)
29	Monomorfo	Presente	Ausente/ausente	Ausente	Ausente	Presente
30	Monomorfo	Na	Na	Na	Na	Na
31	Polimorfo	Presente	Presente/ausente	Presente (E)	Ausente	Presente (I)
32	Monomorfo	Intensa	Ausente/ausente	Ausente	Ausente	Presente
33	Polimorfo	Intensa	Presente**/presente	Ausente	Ausente	Presente
34	Monomorfo	Presente	Presente/presente	Presente	Na	Presente
35	Monomorfo	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Na

D: discreta; E: extensa; F: focal; I: intensa; Na: não avaliável; *linfática e sanguínea; **linfática

Figura 5: Representação gráfica da análise dos níveis de profundidade* dos melanomas primários da mucosa oral (*segundo Prasad et al., 2004)

Figura 6: Aspectos histopatológicos dos melanomas primários da mucosa oral

Legendas da Figura 6: Aspectos histopatológicos dos melanomas primários da mucosa oral

A, B e C: Aspectos gerais de espécimes de melanoma oral: em A e B, melanomas de nível III, com invasão de toda a faixa de lâmina própria e submucosa (medidas maiores que 3mm. Em C, melanoma nível II, superficialmente invasivo, medindo cerca de 0,35mm (hematoxilina e eosina, aumento original X40).

D e E: Proliferação de ninhos de melanócitos neoplásicos intra-epiteliais (hematoxilina e eosina, aumento original X100 e X400, respectivamente).

F: Ninhos de melanócitos neoplásicos pigmentados na lâmina própria papilar (hematoxilina e eosina, aumento original X400).

G: Lençol de melanócitos neoplásicos, ocupando toda a lâmina própria. Epitélio de revestimento com atrofia e retificação dos cones epiteliais (hematoxilina e eosina, aumento original X100).

H: Melanócitos neoplásicos pigmentados próximos a vasos sanguíneos neoformados na lâmina própria (hematoxilina e eosina, aumento original X400).

I, J, K e L: Aspectos morfológicos dos melanócitos neoplásicos: células com intenso pleomorfismo nuclear e hipercromasia (I), melanócitos neoplásicos fusiformes (J) e melanócitos neoplásicos pequenos organizados em ninhos pouco coesos em K e L (hematoxilina e eosina, aumento original X400).

FIGURA 7: “*Tissue microarray*” (TMA) contendo 53 espécimes de melanoma oral provenientes de 34 doentes.

Legendas da Figura 7:

A-E: Exemplos das áreas neoplásicas contidos no TMA

Figura 8: Detalhes dos aspectos histopatológicos dos melanomas primários da mucosa oral

Legendas da Figura 8: Detalhes dos aspectos histopatológicos dos melanomas primários da mucosa oral

A e B: Focos de necrose de permeio aos melanócitos neoplásicos (hematoxilina e eosina, aumento original X400).

C: Ninhos neoplásicos separados por traves fibrosas pigmentadas. Notar o intenso pleomorfismo celular (hematoxilina e eosina, aumento original X400).

D, E e F: Invasão tumoral: destruição das glândulas salivares mucosas (D), tecido adiposo (E) e osso (F) (hematoxilina e eosina, aumento original X100 em D e X400 E e F).

G – L: Relação do melanoma com vasos e nervos: angiogênese em G e H; invasão perivascular – vaso linfático (I) e vaso sanguíneo (J); êmbolo vascular (K) e invasão perineural (L) (hematoxilina e eosina, aumento original X400).

5.3 Resultados imunoistoquímicos

A expressão de integrinas e imunoglobulinas foi variável e localizada principalmente na membrana das células positivas. Todas as moléculas avaliadas neste estudo foram observadas nas amostras de controle positivo (pele normal), porém todas foram negativas para a expressão da integrina alfa-2, alfa-6, alfa-V, e beta-1. Todos os casos que exibiam um componente *in situ* foram consistentemente positivos para a subunidade alfa-3, representando um total de 94% de todas as amostras analisadas (30 casos). Em contraste, 66% dos casos (21 pacientes) foram alfa-4-positivos, e 85% (29 casos) foram positivas para a integrina alfa-5. Além disso, 54,5% das amostras (19 casos) foram integrina beta-3-positivo e apenas 28% (9 casos) foram positivas para a integrina beta-4. Tais resultados estão organizados na Tabela 5 e ilustrados na Figura 9.

A molécula de adesão CD54 (ICAM) foi altamente expressa em células de melanoma e melanoma *in situ* pigmentados. A expressão das proteínas CD146 e CD16 também foram mais intensas para os melanomas *in situ* e tumores com uma arquitetura organoide. Em termos percentuais, o CD54 foi negativo em 53% dos casos (17 casos), CD66 foi negativo em 69% (20 casos), CD146 estava ausente em 50% (16 casos) e 28% (9 casos) não expressaram CD166. Os resultados estão demonstrados na Tabela 6 e ilustrados na Figura 10.

Tabela 5: Relação entre a expressão de integrinas e aspectos clínico-patológicos dos casos de melanoma primário da mucosa oral

	Total de casos analisados	Alfa3			Alfa4			Alfa5			Beta3			Beta 4		
		Neg (%)	Pos (%)	P	Neg (%)	Pos (%)	P	Neg (%)	Pos (%)	P	Neg (%)	Pos (%)	P	Neg (%)	Pos (%)	P
Gênero																
Feminino	17	02 (12)	15 (88)	0,498	06 (35)	11 (65)	0,728	02 (12)	15 (88)	0,350	09 (53)	08 (47)	0,654	11 (69)	05 (31)	1,00
Masculino	16	00 (0)	12 (100)		05 (42)	07 (58)		03 (25)	09 (75)		05 (42)	07 (58)		12 (75)	04 (25)	
Recorrência																
Não	14	01 (8)	11 (92)	1,00	05 (36)	09 (64)	1,00	02 (14)	12 (86)	1,00	07 (50)	07 (50)	0,327	10 (71)	04 (29)	1,00
Sim	10	00 (0)	10 (100)		03 (30)	07 (70)		02 (20)	08 (80)		03 (30)	07 (70)		07 (70)	03 (30)	
Metástase																
Sem	02	00 (0)	02 (100)	1,00	01 (50)	01 (50)	0,526	00 (0)	02 (100)	1,00	01 (50)	01 (50)	1,00	02 (100)	00 (0)	0,526
Com	21	01 (5)	19 (95)		06 (29)	15 (71)		03 (14)	18 (86)		08 (38)	13 (62)		13 (62)	08 (38)	
Grau histológico																
II	05	00 (0)	03 (100)	1,00	02 (50)	02 (50)	0,601	02 (40)	03 (60)	0,155	04 (80)	01 (20)	0,161	03 (75)	01 (25)	0,600
III	28	02 (7)	93 (93)		09 (32)	18 (68)		3 (11)	25 (89)		11 (41)	16 (59)		20 (74)	07 (26)	
Tipo celular																
Monomórfico	16	02 (13)	13 (87)	0,226	05 (33)	10 (67)	0,809	01 (6)	15 (94)	0,335	09 (56)	07 (44)	0,288	12 (80)	03 (20)	0,685
Polimórfico	17	00	16 (100)		06 (37.5)	10 (62.5)		04 (23.5)	13 (76.5)		06 (37.5)	10 (76.5)		11 (69)	05 (31)	
Necrose																
Ausente	19	02 (12)	15 (88)	0,498	06 (35)	11 (65)	0,728	02 (10.5)	17 (89.5)	0,350	09 (50)	09 (50)	0,654	12 (71)	05 (29)	0,822
Presente	15	00 (0)	12 (100)		05 (42)	07 (58)		03 (25)	09 (75)		05 (42)	07 (58)		08 (67)	04 (33)	
Invasão vascular																
Ausente	12	02 (20)	08 (80)	0,130	04 (36)	07 (64)	1,00	03 (25)	09 (75)	0,338	08 (67)	04 (33)	0,056	09 (82)	02 (18)	0,677
Presente	20	00	20 (100)		07 (37)	12 (63)		02 (10)	18 (90)		06 (32)	13 (68)		13 (68)	06 (32)	
Invasão neural																
Ausente	23	02 (9,5)	19 (90.5)	1,00	08 (38)	13 (62)	1,00	03 (13)	20 (87)	0,604	11 (50)	11 (50)	0,456	16 (76)	05 (24)	0,666
Presente	09	00	09 (100)		03 (33)	06 (67)		02 (22)	07 (78)		03 (33)	06 (67)		06 (67)	03 (33)	
Melanina																
Escassa/ausente	10	01 (10)	09 (90)	1,00	04 (40)	06 (60)	0,717	02 (20)	08 (80)	0,627	04 (40)	06 (60)	0,773	05 (50)	05 (50)	0,076
Presente	20	01 (5)	20 (95)		07 (33)	14 (67)		03 (13)	20 (87)		10 (45.5)	12 (54.5)		17 (81)	04 (19)	

Valor p: teste exato de Fisher

Figura 9: Expressão de integrinas nos casos de melanoma primário da mucosa oral

Legendas da Figura 9: Expressão de integrinas nos casos de melanoma primário da mucosa oral

A: alfa3: expressão nos espaços intercelulares de melanócitos neoplásicos (aumento original X400).

B: alfa4: expressão da proteína nos espaços intercelulares de ninhos de melanoma na junção epitélio/ lâmina própria (aumento original X400).

C: alfa4: expressão nos espaços intercelulares de melanócitos neoplásicos dispostos em teças (aumento original X400).

D: alfa5: expressão da proteína nos espaços intercelulares de ninhos de melanócitos pigmentados (aumento original X400).

E: alfa5: expressão nos espaços intercelulares de raros melanócitos neoplásicos (aumento original X400).

F: beta3: expressão nos espaços intercelulares de melanócitos neoplásicos dispostos em tecas (aumento original X400).

G: beta3: expressão da proteína nos espaços intercelulares de ninhos de melanoma próximos a um vaso sanguíneo (aumento original X400).

H: beta3: expressão nos espaços intercelulares de melanócitos neoplásicos dispostos em lençol logo abaixo do epitélio de superfície (aumento original X400).

I: beta4: presença da proteína em raríssimos melanócitos neoplásicos (aumento original X400).

Tabela 6: Relação entre a expressão de imunoglobulinas e aspectos clínico-patológicos dos casos de melanoma primário da mucosa oral													
	Total de casos analisados	CD54			CD66			CD146			CD166		
		Neg (%)	Pos (%)	P	Neg (%)	Pos (%)	P	Neg (%)	Pos (%)	P	Neg (%)	Pos (%)	P
Gênero													
Feminino	16	06 (37,5)	10 (62,5)	0,077	11 (69)	03 (31)	0,427	08 (50)	08 (50)	1,00	05 (31)	11 (69)	1,00
Masculino	16	11 (69)	05 (31)		09 (60)	06 (40)		08 (50)	08 (50)		04 (25)	12 (75)	
Recorrência													
Não	14	08 (57)	06 (43)	0,527	09 (64)	05 (36)	0,418	06 (43)	08 (57)	0,527	04 (29)	10 (71)	0,506
Sim	10	05 (50)	05 (50)		07 (78)	02 (22)		05 (50)	05 (50)		02 (20)	08 (80)	
Metástase													
Sem	02	00 (0)	02 (100)	0,178	00 (0)	02 (100)	0,091	01 (50)	01 (50)	1,00	00 (0)	02 (100)	1,00
Com	21	13 (62)	08 (38)		15 (75)	05 (25)		10 (48)	11 (52)		05 (24)	16 (76)	
Grau histológico													
II	04	03 (75)	01 (25)	1,00	03 (75)	01 (25)	0,600	03 (75)	01 (25)	0,333	01 (25)	03 (75)	1,00
III	27	13 (48)	14 (52)		16 (67)	08 (33)		12 (44)	15 (56)		08 (30)	19 (70)	
Tipo celular													
Monomórfico	15	05 (33)	10 (67)	0,049	10 (77)	03 (23)	0,435	07 (47)	08 (53)	0,853	06 (40)	09 (60)	0,252
Polimórfico	17	11 (69)	05 (31)		09 (53)	08 (47)		08 (50)	08 (50)		03 (19)	13 (81)	
Necrose													
Ausente	17	10 (59)	07 (41)	0,070	12 (75)	04 (25)	0,268	09 (53)	08 (47)	0,268	07 (41)	10 (59)	0,160
Presente	12	07 (58)	05 (42)		06 (55)	05 (45)		06 (55)	05 (45)		02 (17)	10 (83)	
Invasão vascular													
Ausente	11	06 (55)	05 (45)	0,919	08 (80)	02 (20)	0,417	07 (64)	04 (36)	0,256	06 (55)	05 (45)	0,042
Presente	19	10 (53)	09 (47)		11 (61)	07 (39)		08 (42)	11 (58)		03 (16)	16 (84)	
Invasão neural													
Ausente	21	13 (62)	08 (38)	0,236	14 (70)	06 (30)	1,00	10 (48)	11 (52)	1,00	08 (38)	13 (62)	0,210
Presente	09	03 (33)	06 (67)		05 (62,5)	03 (37,5)		05 (56)	04 (44)		01 (11)	08 (89)	
Melanina													
Presente	10	07 (70)	03 (30)	0,242	08 (89)	01 (11)	0,120	05 (50)	05 (50)	0,901	03 (30)	07 (70)	0,935
Ausente	20	10 (56)	08 (44)		12 (60)	08 (40)		11 (55)	09 (45)		05 (25)	15 (70)	

Valor p: teste exato de Fisher

Figura 10: Expressão de imunoglobulinas nos casos de melanoma primário da mucosa oral

Legendas da Figura 10: Expressão de imunoglobulinas nos casos de melanoma primário da mucosa oral

A: CD54: expressão nos espaços intercelulares de raros melanócitos neoplásicos (aumento original X400).

B: CD54: expressão nos espaços intercelulares de melanócitos neoplásicos dispostos em lençol (aumento original X400).

C e D: CD54: expressão da proteína nos espaços intercelulares de ninhos de melanoma na junção epitélio/ lâmina própria (aumento original X400).

E: CD66: expressão nos espaços intercelulares de raros melanócitos neoplásicos (aumento original X400).

F: CD66: expressão nos espaços intercelulares de melanócitos neoplásicos dispostos em lençol (aumento original X400).

G: CD146: expressão da proteína nos espaços intercelulares de ninhos de melanoma na junção epitélio/ lâmina própria (aumento original X400).

H: CD146: expressão nos espaços intercelulares de melanócitos neoplásicos dispostos em lençol (aumento original X400).

I: CD166: presença da proteína nos ninhos neoplásicos da junção epitélio/ lâmina própria (aumento original X400).

J: CD166: Moderada positividade para esta proteína em melanócitos neoplásicos dispostos em lençol (aumento original X400).

6.DISSCUSSÃO

6.DISCUSSÃO

As características clínicas encontradas em nossa série casuística corroboram a literatura. A média de idade foi de 61 anos, ao passo que outros autores referem uma maior incidência entre a quinta e sexta décadas de vida (Lopez-Graniel et al., 1999; Ulusal et al., 2003). Em relação ao gênero, não foi observada nenhuma predileção, assim como descrito alguns relatos (Takagi et al., 1974; Rapini et al., 1985; Panje e Moran, 1986; Lee et al., 1994; Manolidis e Donald, 1997; Chidzonga et al., 2007).

Aproximadamente 80% dos melanomas orais localizam-se no palato duro ou rebordo alveolar superior (Águas et al., 2009). Semelhantemente, esta casuística demonstrou um acometimento de 71,42% do palato duro, representando o local mais afetado pelo MPMO. Outros locais relatados com frequência na literatura são mucosa jugal, língua e soalho da boca (Lopez-Graniel et al., 1999; Rapidis et al., 2003; González-García et al., 2005; Chidzonga et al., 2007), ao passo que nossos achados também incluíram rebordo alveolar, mucosa jugal, sulco vestibular e lingual.

Lesões de MPMO caracterizam-se por apresentar difícil tratamento, e a conduta tomada na maioria dos casos é baseada na possibilidade cirúrgica e na qualidade de vida do indivíduo (Storm et al., 1978; Baltchford et al., 1986; Tanaka et al., 2004). Em nossa série casuística, as modalidades de tratamento abrangeram cirurgias (16 casos), crioterapia, quimioterapia e radioterapia objetivando-se atingir a maior eficácia terapêutica, visto que a efetividade da imunoterapia, quimioterapia e radioterapia como conduta em melanomas da

mucosa oral ainda precisa ser detalhadamente elucidada (Prasad et al., 2002; Prasad et al., 2003; Ulusal et al., 2003).

Em geral, o prognóstico para doentes com MPMO é desfavorável, exibindo taxas de sobrevida menores comparadas às de outros melanomas. Ainda é desconhecido se o pior prognóstico do MPMO ocorre devido às diferenças em seu comportamento biológico, à rica vascularização, ao diagnóstico tardio ou às suas características anatômicas complexas, o que dificulta a excisão completa do tumor (Ulusal et al., 2003). A ocorrência de recidiva local foi observada em 6 casos os quais foram submetidos ao tratamento cirúrgico. A eficácia de outras terapias, usadas na maioria dos casos como paliativos, não pode ser analisadas objetivamente.

Em 2004, Prasad e colaboradores propuseram uma classificação histopatológica baseada no nível de invasão do melanoma a qual utilizamos em nosso estudo. A maioria dos casos incluídos no presente trabalho foi diagnosticada com a doença no nível III de invasão, representando 80% dos pacientes (28 de 35), o que demonstra que os doentes chegam para atendimento somente quando há poucas opções terapêuticas. Tal fato pode ser devido principalmente à demora no processo de diagnóstico de lesões orais pigmentadas e, portanto, profissionais envolvidos na área devem ficar atentos a esta possibilidade durante o exame clínico. Conforme sugerido por Prasad e colaboradores (2004), o nível histopatológico do tumor é o fator indicativo mais importante de uma menor sobrevida, sendo que os de nível III tendem a apresentar uma evolução desfavorável.

Diversas morfologias são descritas no MPMO (Prasad et al., 2004), e estas também foram observadas em nossa série e o nível elevado de

pleomorfismo celular foi uma característica comum a todos os tumores analisados. A morfologia celular nos casos analisados abrangeu desde os tipos epitelióide e fusiforme até misto, sendo que 18 casos foram classificados como monomorfos e 17 como polimorfos. Esta classificação não apresenta impacto no comportamento tumoral (Prasad et al., 2004), embora tenha sido observada uma incidência maior de invasão vascular e necrose nos tumores polimorfos.

Mais da metade desta casuística revelou invasão vascular (60,61%), cuja presença é um importante fator de prognóstico adverso para melanoma, uma vez que o acesso do tumor à circulação linfática e sanguínea facilita a sua disseminação para locais distantes (Prasad et al., 2002). Seguindo esta linha de análise, metástase à longa distância é o fator de prognóstico mais impactante para esses tumores (Peckitt e Wood, 1990; Ohashi et al., 1992; Umeda e Shimada, 1994; Tanaka et al., 1998), sendo observada em 11 casos de nossa amostra, mais comumente no pulmão. Adicionalmente, observou-se envolvimento de linfonodo regional em 18 de 35 casos, totalizando 52,94%.

Atualmente, alterações genéticas e moleculares aplicadas ao desenvolvimento e comportamento biológico dos melanomas são alvo de estudos dos mais importantes grupos internacionais. Essas pesquisas visam identificar fatores que possam ser eventualmente aplicados no desenvolvimento de quimioterápicos e imunoterápicos para o tratamento e controle da neoplasia.

Dentre os diversos eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento dos melanomas, a perda de adesão intercelular e de adesão células-matriz extracelular em geral é um dos processos que permitem a invasão tumoral e desenvolvimento de metástases. A partir de fenômenos de alterações na

adesão, as células tumorais se desprendem da massa tumoral inicial e atingem os vasos para migrarem para locais distantes do tumor primário (Haass et al, 2005). O nosso estudo avaliou a expressão de moléculas de adesão e demonstrou que estas moléculas estavam alteradas no MPMO na maioria dos casos analisados.

Em circunstâncias normais, a adesão queratinócito-melanócito é mediada por vários tipos de moléculas de adesão. A habilidade de se aderir a proteínas da matriz extracelular é essencial para a organização tecidual, importante fator em tumores para o estabelecimento de novas conexões com diferentes microambientes e para fontes de sinalização molecular que, muitas vezes oferecem vantagens de sobrevivência para células neoplásicas (Haass et al., 2005).

As integrinas muitas vezes facilitam a invasão de células neoplásicas através da migração via matriz extracelular (MEC). Por outro lado, o dímero composto por duas subunidades que compõem sua estrutura é caracterizado por ligações não-covalentes, o que possibilita rápida mobilização no processo de migração celular, observado nos diversos eventos de uma neoplasia (Hynes, 2002; Haass et al., 2005).

Em nosso estudo, embora diversos esforços tenham sido empenhados na bancada para otimização dos anticorpos, a subunidade beta-1 jamais foi positiva nos casos de melanoma estudados, mesmo tendo exibido bons resultados nos controles normais (pele).

Alguns relatos referem uma superexpressão das integrinas alfa-3, -4 e -5 em melanomas cutâneos, o que foi igualmente observado nos nossos pacientes (Moretti et al., 1993; Kuphal et al., 2005). Integrina alfa-4 está

associada com a acumulação de células neoplásicas, e alfa-3 relaciona-se com a maior mobilidade das células de tumor (Yoshinaga et al., 1993; Zhu et al., 2002). Em casos de melanoma da mucosa oral, há possibilidade de que estas integrinas formem heterodímeros com outras subunidades beta, o que explicaria a ausência de expressão de beta-1. Alternativamente, as integrinas alfa-3, -4 e -5 podem não ser funcionais. Subunidades de integrina alfa são geralmente sintetizadas em excesso e armazenadas nas células, mas não são ativadas a menos que estejam associadas a uma integrina beta 1 (Heino et al., 1989), porém, sua funcionalidade não pode ser avaliada por meio da imunistoquímica.

Em geral, as amostras foram negativas para as integrinas beta-3 e beta-4, que também podem formar heterodímeros com subunidades alfa. Estes resultados corroboram com a hipótese de que as integrinas estão muito alteradas em MPMO, e estas alterações dependentes do microambiente e da MEC podem ser distintas das observadas em melanomas cutâneos. Vários estudos têm relatado que as integrinas associadas aos melanomas cutâneos estão correlacionadas ao crescimento de tumores e metástases, sendo o heterodímero alpha-V/beta-3 o mais comum e o que promove adesão e migração celular ao interagir com a MEC (Mortarini e Anichini, 1993; Danen et al., 1995; Johnson et al., 1999; Seftor et al., 1999; McGary et al., 2002). No melanoma, a expressão da subunidade alfa-V não sofre grandes alterações, ao passo que a subunidade beta-3 é amplamente positiva nos casos em que o crescimento tumoral é predominantemente vertical (Albelda et al., 1990; Schadendorf et al., 1993; Danen et al., 1995; Natali et al., 1997). Na literatura, a expressão de integrina beta-3 é considerada como um marcador de

prognóstico e alvo terapêutico para melanomas cutâneos (Bachmann et al., 2008), no entanto, em nosso estudo, 43% dos casos (15 casos) foram negativos para a integrina beta-3, destacando as peculiaridades do microambiente tumoral de MPMO. Neto e colaboradores (2007) investigaram a expressão da integrina na alpha-V/beta-3 em nevos melanocíticos e melanomas cutâneos e demonstraram que, a expressão do receptor não se alterou independentemente do nível de invasão ou fase de crescimento, o que sugere que a integrina alpha-V/beta-3 não pode ser considerada suficientemente sensível para ser utilizada como um marcador de prognóstico.

A maioria dos estudos que concluíram que a integrina alpha-V/beta-3 está relacionada com progressão tumoral e metástases foram realizados utilizando sistemas in vitro e modelos experimentais em animais. Estes modelos podem exibir um comportamento celular diferente quando comparados com o que ocorre em seres humanos. No entanto, estudos experimentais têm proporcionado avanços significativos na compreensão da biologia do melanoma e demonstraram que a integrina alpha-V/beta-3 também pode influenciar a angiogênese e metástases de melanoma através da regulação das metaloproteases (MMP), tais como MMP-2 (McGary et al, 2002). Outros estudos também demonstraram que a integrina beta-4 é fracamente expressa nos melanomas, porém tal investigação em melanoma cutâneo permanece limitada na literatura (Danen et al., 1994). Para tanto, nossos resultados atuais corroboram esses dados, uma vez que se observou 23 casos (72%) negativos para a expressão beta-4 integrina.

Ao contrário dos melanócitos normais da pele que expressam algumas imunoglobulinas, as células de melanoma apresentam uma superexpressão de

CD54, CD66, CD166 e CD146. A função destes receptores na adesão celular é bem documentada, mas a sua contribuição para o fenótipo de melanoma ainda não é bem elucidado (Haass et al., 2005). No entanto, contrariamente aos dados publicados, observou-se um grande número de casos de MPMO negativos para essas moléculas, o que pode refletir nas peculiaridades desse tipo de melanoma, permanecendo mal definidas devido à raridade dos casos.

A expressão de CD54 também se correlaciona com a progressão de melanoma e o risco de metástases (Johnson et al., 1999). Diversos estudos têm mostrado que a sua presença está elevada em melanomas cutâneos quando comparados a nevos, ao passo que estudos em modelos animais também indicam que sua supressão pode reduzir o potencial metastático de determinados melanomas humanos (Natali et al., 1990; Schadendorf et al., 1993; Schadendorf et al., 1995; Natali et al., 1997). Apesar disso, o papel do CD54 na biologia do melanoma ainda não foi claramente definido. Em nosso estudo, aproximadamente 53% dos casos (17 casos) foram negativos para CD54, mesmo na doença avançada. Tal peculiaridade do melanoma de mucosa não associada à exposição crônica à radiação ultra-violeta deveria ser mais estudada e comparada a mecanismos genéticos da progressão do tumor e fatores locais, como por exemplo citocinas e fatores de crescimento. É importante notar que o CD54 estava associado com a morfologia celular, sendo que os tumores monomorfos foram predominantemente positivos.

CD66, ou CEACAM, está envolvido na adesão intercelular e em cascatas de sinalização, sendo sua expressão considerada como um evento supressor de tumor, uma vez que muitos tumores perdem expressão desta molécula. No entanto, alguns tipos de câncer podem ter expressão aumentada desta

molécula, como se observa em carcinoma de pulmão. Em melanomas cutâneos, a maior expressão de CD66 está associada com o aumento do potencial metastático do tumor (Thies et al., 2002). Neste estudo, 69% dos tumores examinados (20 casos) foram negativos para CD66, indicando que o padrão de expressão desta molécula pode estar associado ao tipo de tumor analisado.

CD146, ou Mel-CAM, medeia a interação homóloga e heteróloga entre melanócitos neoplásicos e células endoteliais (Shih et al., 1997; Johnson et al., 1997). Em células melanocíticas, esta molécula é encontrada em nevus que migram para a derme, e sua expressão em melanócitos malignos parece atingir o seu pico na fase metastática, correlacionando-se com a espessura do tumor (Lehmann et al., 1989; Shih et al., 1994; Johnson et al., 1996). Os estudos em modelos animais demonstraram que o CD146 está associado com o potencial metastático de melanoma e que facilita o extravasamento e a migração celular, possivelmente promovendo ocorrência de novo crescimento neoplásico (Danen et al., 1995; Shih et al., 1997; Xie et al., 1997). Em nosso estudo, 50% dos casos foram positivos para CD146 e foram indicativos de doença avançada por serem visualizados majoritariamente em tumores espessos.

Peculiarmente, em casos onde os componentes da matriz extracelular eram observados no interior do tumor, as células neoplásicas foram fortemente positivas, principalmente, na porção juncional do tumor. Portanto, é possível que a expressão CD146 ocorra em etapas: negativa em melanócitos normais, positiva na fase mais precoce possível (pré-invasivo) do tumor e negativa novamente quando a doença torna-se mais avançada. Contudo, esta hipótese requer mais testes em modelos animais. Além disso, observou-se que dos 21

casos que apresentavam informação sobre a metástase, 52% foram CD146 positivo. No entanto, na análise geral essa expressão não foi estatisticamente significativa.

CD166, ou ALCAM, também promove adesão intercelular homotípica e heterotípica e é expressa principalmente em linhagens de células metastáticas de melanoma, porém ausentes em melanomas primários (Swart et al., 2005). van Kempen e colaboradores (2000) demonstraram através de imunoistoquímica que a expressão de CD166 estava associada com o desenvolvimento e progressão de melanoma. Nosso estudo confirmou tais conclusões apresentadas, exibindo positividade para CD166 em cerca de 72% dos casos de MPMO (23 casos), expressão estatisticamente relevante quando comparada aos casos com invasão vascular. Além disso, em 76% dos pacientes que apresentavam metástase, o tumor foi positivo para CD166, embora não tenha sido estatisticamente significativo provavelmente devido ao número reduzido da amostra.

Embora os resultados do presente trabalho destaquem importantes alterações na expressão de moléculas de adesão em melanoma oral primário da mucosa, somente alguns parâmetros clínico-patológicos significativos foram estatisticamente relacionados com essas alterações. Tal fato se deve principalmente à raridade da lesão, o que limita sua ocorrência e consequentemente a análise conclusiva de uma casuística maior. Na tentativa de colaborar com esse conhecimento, modelos *in vitro* têm sido desenvolvidos em nosso laboratório para investigar novos mecanismos envolvidos no MPMO.

7.CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. O melanoma primário da mucosa oral é uma doença que incide na vida adulta e acomete principalmente a gengiva e o palato duro. Não há evidências para se estabelecer a origem da lesão a partir de lesões prévias ou associada a qualquer fator predisponente. Morfologicamente as lesões analisadas mostraram padrões de doença em estágio avançado, provavelmente decorrente de atrasos no processo diagnóstico. Metástases são frequentes e a sobrevida é curta.

2. Os padrões de expressão de determinadas integrinas e imunoglobulinas encontram-se alterados;

3. Subunidades específicas de integrinas e imunoglobulinas parecem participar da patogênese do melanoma oral (principalmente do mecanismo de metástase e invasão vascular): destacam-se neste item as subunidades integrina beta-3 e CD166.

8. REFERÊNCIAS

Aguas SC, Quarracino MC, Lence AN, Lanfranchi-Tizeira HE. Primary melanoma of the oral cavity: Ten cases and review of 177 cases from literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009 Jun 1;14 (6):E265-71.

Albelda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart R, Damjanovich L, Herlyn M, Buck CA. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res*. 1990; 50(20): 6757-6764.

Aldovini, D.; Demichelis, F.; Doglioni, C.; Di, V.; Galligioni, E.; Brugnara S.; Zeni, B.; Griso, C.; Pegoraro, C.; Zannoni, M.; Gariboldi M; Balladore E; Mezzanzanica D; Canevari S; Barbareschi M. M-CAM expression as marker of poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Cancer*. 2006; 119: 1920–1926.

Ali S, Ali S. Role of c-kit/SCF in cause and treatment of gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Gene*. 2007;401:38–45.

Aricescu, A. R. e Jones, E. Y. Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules: zippers and signals. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2007; 19, 543–550

Bachar G, Loh KS, O’Sullivan B, Goldstein D, Wood S, Brown D, Irish J. Mucosal melanomas of the head and neck: experience of the Princess Margaret Hospital. *Head Neck*. 2008; 30:1325–1331.

Bachmann IM, Ladstein RG, Straume O, Naumov GN, Akslen LA. Tumor necrosis is associated with increased alphavbeta3 integrin expression and poor prognosis in nodular cutaneous melanomas. *BMC Cancer*. 2008 Dec; 8:362.

Balch CM, Wilkerson JA, Murad TM, Soong SJ, Ingalls AL, Maddox WA. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. *Cancer*. 1980 Jun; 45(12): 3012-3017.

Balch CM e Milton GW. Cutaneous Melanoma: Clinical Management and Treatment Results Worldwide. Philadelphia: Lippincott, 1985, p.329.

Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ, Atkins MB, Thompson JF. Cutaneous Melanoma. Quality Medical Publishing, Inc. 2009.

Baltchford SJ, Koopmann CF Jr, Coulthard SW. Mucosa melanoma of the head and neck. *Laryngoscope*. 1986 Sep; 96(9Pt1): 929-34.

Batsakis JG, Regezi JA, Solomen AR, Rice DH. The pathology of head and neck tumors: mucosal melanomas. *Head Neck Surg*. 1982; 4:404–418.

Benlyazid A, Thariat J, Temam S, Malard O, Florescu C, Choussy O, et al. Postoperative radiotherapy in head and neck mucosal melanoma: a GETTEC study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010; 136:1219–1225.

Berthelsen A, Andersen AP, Jensen S, Berthelsen A, Andersen AP, Jensen TS, Hansen HS. Melanomas of the mucosa in the oral cavity and upper respiratory passages. *Cancer*. 1984; 54:907–912.

Boudreau NJ e Jones PL. Extracellular matrixx and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J*. 1999 May 1; 339 (Pt 3): 481-488.

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*. 1970 Nov ; 172 (5): 902-908.

Brümmer J, Ebrahimnejad A, Flayeh R, Schumacher U, Löning T, Bamberger AM, Wagener C. cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin beta(3). *Am J Pathol*. 2001 Aug; 159(2): 537-46.

Buchner A, Hansen LS. Pigmented nevi of the oral mucosa: a clinicopathologic study of 32 new cases and review of 75 cases from the literature. Part II. Analysis of 107 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980; 49:55–62.

Bulliard JL. Site-specific risk of cutaneous malignant melanoma and pattern of sun exposure in New Zealand. *Int J Cancer*. 2000 Mar 1; 85(5): 627-632.

Cavallaro U, Dejana E. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Mar; 12 (3): 189-97.

Chang AE, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer*. 1998;83:1664–78.

Chidzonga MM, Mahomva L, Marimo C, Makunike-Mutasa R. Primary Malignant Melanoma of the Oral Mucosa. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Jun; 65:1117-1120.

Clark EA e Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the Road taken. *Science*. 1995 Apr 14; 268 (5208): 233-239.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol*. 1984 Dec; 15 (12): 1147-1165.

Conley J, Pack GT. Melanoma of the mucous membranes of the head and neck. *Arch Otolaryngol*. 1974; 99:315–319.

Conley J, Hamaker RC. Melanoma of the head and neck. *Laryngoscope*. 1977; 87:760–764.

Cruz F 3rd, Rubin BP, Wilson D, Town A, Schroeder A, Haley A, Bainbridge T, Heinrich MC, Corless CL. Absence of BRAF and NRAS mutations in uveal melanoma. *Cancer Res*. 2003;63:5761–5766.

Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005;353:2135–2147.

Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*. 2006;24:4340–4346.

Danen EH, Ten Berge PJ, Van Muijen GN, Van 't Hof-Grootenboer AE, Bröcker EB, Ruiter DJ. Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. *Histopathology*. 1994; 24(3): 249-256.

Danen EH, Van Muijen GN, Ruiter DJ. Role of integrins as signal transducing cell adhesion molecules in human cutaneous melanoma. *Cancer Surv*. 1995; 24: 43-65.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun; 417 (6892): 949 –954.

Day CL, Harrist TJ, Gorstein F, Sober AJ, Lew RA, Friedman RJ, Pasternack BS, Kopf AW, Fitzpatrick TB, Mihm MC Jr. Malignant melanoma. Prognostic significance of “microscopic satellites” in the reticular dermis and subcutaneous fat. *Ann Surg*. 1981 Jul; 194(1): 108-112.

Day CL, Harrist TJ, Lew RA, Mihm MC Jr. Classification of malignant melanomas according to the histologic morphology of melanomas nodules. *J Dermatol Surg Oncol*. 1982a Oct; 8(10): 874-875.

Day CL, Lew RA, Mihm MC Jr, Sober AJ, Harris MN, Kopf AW, Fitzpatrick TB, Harrist TJ, Golomb FM, Postel A, Hennessey P, Gumport SL, Raker JW, Malt RA, Cosimi AB, Wood WC, Roses DF, Gorstein F, Rigel D, Friedman RJ, Mintzis MM, Grier RW. A multivariate analysis of prognostic factors for melanoma patients with lesions greater than or equal to 3.65 mm in thickness. The importance of revealing alternate Cox models. *Ann Surg*. 1982b Jan ;195 (1): 44-49.

Day CL, Mihm MC Jr, Lew RA, Harris MN, Kopf AW, Fitzpatrick TB, Harrist TJ, Golomb FM, Postel A, Hennessey P, Gumport SL, Raker JW, Malt RA, Cosimi AB, Wood WC, Roses DF, Gorstein F, Rigel D, Friedman RJ, Mintzis MM, Sober AJ.. Prognostic factors for clinical stage I melanoma of intermediate thickness (1.51-3.39 mm). A conceptual model for tumor growth and metastasis. *Ann Surg*. 1982c Jan; 195(1): 35-43.

Day CL, Mihm MC Jr, Sober AJ Harris MN, Kopf AW, Fitzpatrick TB, Lew RA, Harrist TJ, Golomb FM, Postel A, Hennessey P, Gumport SL, Raker JW, Malt RA, Cosimi AB, Wood WC, Roses DF, Gorstein F, Rigel D, Friedman RJ, Mintzis MM. Prognostic factors for melanoma patients with lesions 0.76-1.69 mm in thickness. *Ann Surg*. 1982d Jan; 195 (1): 30-34.

Elder D, Guerry D 4th, Epstein MN, Zehngebot L, Lusk E, Van Horn M, Clark WH Jr. Invasive malignant melanoma lacking competence for metastasis. *Am J Dermatopathol*. 1980 Summer; 6 Suppl: 55-61.

Elder D, Elenitsas R. Benign pigmented and malignant melanoma. In Elder D, editors. *Lever's histopathology of the skin*, 8th ed. Philadelphia; Lippincott-Raven, 1997. p. 625-684.

Elder DE. Pathology of melanoma. *Clin Cancer Res.* 2006 Apr 1; 12 (7 pt 2): 2308s-2311s

Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M. Regulation of integrin activity and signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun; 1790(6): 431-444.

Gambichler T, Grothe S, Rotterdam S, Altmeyer P, Kreuter A. Protein expression of carcinoembryonic antigen cell adhesion molecules in benign and malignant melanocytic skin lesions. *Am J Clin Pathol* 2009;131(6):782-87.

Garzino-Demo P, Fasolis M, Maggiore GM, Pagano M, Berrone S. Oral mucosal melanoma: a series of case reports. *J Cranio Maxillofac Surg.* 2004 Aug; 32(4): 251-57.

Gavriel H, McArthur G, Sizeland A, Henderson M. Review: mucosal melanoma of the head and neck. *Melanoma Res.* 2011; 21:257–266

Gilligan D, Slevin NJ. Radical radiotherapy for 28 cases of mucosal melanoma in the nasal cavity and sinuses. *Br J Radiol.* 1991; 64:1147–1150.

González-García R, Naval-Gías L, Martos PL, Nam-Cha SH, Rodríguez-Campo FJ, Muñoz-Guerra MF, Sastre-Pérez J. Melanoma of the oral mucosa. Clinical cases and review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005 May-Jul;10(3):264-71.

Gu GM, Epstein JB, Morton TH Jr. Intraoral melanoma: long-term follow-up and implication for dental clinicians. A case report and literature review. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Oct; 96 (4): 404-413.

Guevara-Canales J O, Gutiérrez-Morales M M, Sacsquispe-Contreras S J, Sánchez-Lihón J, Morales-Vadillo R. Malignant melanoma of the oral cavity. Review of the literature and experience in a Peruvian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 Mar; 17(2):e206-211.

Guzzo M, Grandi C, Licitra L, Guzzo M, Grandi C, Licitra L, et al. Mucosal malignant melanoma of head and neck: forty-eight cases treated at Istituto Nazionale Tumori of Milan. *Eur J Surg Oncol* 1993; 19:316–319.

Haass NK, Smalley KS, Herlyn M. The role of altered communication in melanoma progression. *J Mol Histol*. 2004 Mar; 35(3): 309-318.

Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigm Cell Res*. 2005 Jun; 18(3): 150-159.

Haass NK e Herlyn M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2005 Nov; 10(2):153-163

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7; 100 (1), 57–70.

Harrison DFN. Malignant melanoma arising in the nasal mucous membrane. *J Laryngol Otol* 1976; 90:993–1005.

Harrist TJ, Rigel DS, Day CL Jr, Sober AJ, Lew RA, Rhodes AR, Harris MN, Kopf AW, Friedman RJ, Golomb FM et al . “Microscopic satellites” are more highly associated with regional lymph nodes metastases than is primary melanoma thickness. *Cancer*. 1984 May; 53(10): 2183-2187.

Heino J, Ignatz RA, Hemler ME, Crouse C, Massagué J. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor- β . Concomitant regulation of integrins that share a common β 1 subunit. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989; 164(1): 380-388.

Heino J. The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling function. *Matrix Biol*. 2000 Aug; 19(4): 319-323.

Hemler ME. Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1998 Oct; 10(5): 578-585.

Hicks MJ, Flaitz CM. Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. *Oral Oncol*. 2000 Mar; 36(2): 152-69.

Holmstrom M, Lund VJ. Malignant melanomas of the nasal cavity after occupational exposure to formaldehyde. *Br J Ind Med*. 1991; 48: 9-11.

Hsu M, Andl T, Li G, Meinkoth JL, Herlyn M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci*. 2000 May; 113 (Pt 9): 1535-42.

Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 1987 Feb 27; 48(4): 549-554.

Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992 Apr 3; 69(1): 11-25.

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002 Sep; 110(6):673-687.

Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwable W, Riethmüller G. De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989 Jan; 86 (2), 641–644.

Johnson JP, Rummel MM, Rothbacher U, Sers C. MUC18: A cell adhesion molecule with a potential role in tumor growth and tumor cell dissemination. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996; 213 (Pt 1): 95-105.

Johnson JP, Bar EM, Jansen B, Markhof E. Melanoma progression-associated glycoprotein MUC18/MCAM mediates homotypic cell adhesion through interaction with a heterophilic ligand. *Int J Cancer* 1997; 73: 769–774.

Johnson RC, Fenn NJ, Horgan K, Mansel RE. Follow-up of patients with a thin melanoma. *Br J Surg*. 1999 May; 86(5): 619-621.

Jones JL e Walker RA. Integrins: a role as cell signaling molecules. *J Clin Pathol Mol Pathol*. 1999; 52: 208-213.

Krengli M, Masini L, Kaanders JH, Maingon P, Oei SB, Zouhair A et al. Radiotherapy in the treatment of mucosal melanoma of the upper aerodigestive tract: analysis of 74 cases. A Rare Cancer Network study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006; 65:751–759.

Kristiansen G, Yu Y, Schluns K, Sers C, Dietel M, Petersen I. Expression of the cell adhesion molecule CD146/MCAM in non-small cell lung cancer. *Anal. Cell. Pathol*. 2003, 25, 77–81.

Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2005 Jun; 24(2): 195-222.

LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasain A. (Eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. IARC Press: Lyon 2006.

Lee SP, Shimizu KT, Tran LM, Juillard G, Calcaterra TC. Mucosal melanoma of the head and neck: the impact of local control on survival. *Laryngoscope*. 1994; 104:121–126.

Lefevre M, Vergier B, Balme B, Thiebault R, Delaunay M, Thomas L, Beylot-Barry M, Machet L, De Muret A, Bioulac-Sage P, Bailly C. Relevance of vertical growth pattern in thin level II cutaneous superficial spreading melanomas. *Am J Surg Pathol*. 2003 Jun; 27 (6):717-724.

Lehmann JM, Riethmüller G, Johnson JP. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86(24): 9891-9895.

Lengyel E, Gilde K, Remenár E, Ésik O. Malignant mucosal melanoma of the head and neck – a review. *Pathol Oncol Res*. 2003 Apr; 9(1): 7-12.

Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *STEM CELLS*. 2005;23:16–43.

Leon P, Daly JM, Synnestvedt M, Schultz DJ, Elder DE, Clark WH Jr. The prognostic implications of microscopic satellites in patients with stage I melanoma. *Arch Surg*. 1991 Dec; 126(12): 1461-1468,

Li G, Herlyn M. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today*. 2000 Apr; 6(4): 163-169.

Liu WF, Ji SR, Sun JJ, Zhang Y, Liu ZY, Liang AB, Zeng HZ. CD146 Expression Correlates with Epithelial-Mesenchymal Transition Markers and a Poor Prognosis in Gastric Cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13(5):6399-406.

Lopez-Graniel CM, Ochoa-Carrillo FJ, Meneses-García A. Malignant melanoma of the oral cavity: diagnosis and treatment experience in a Mexican population. *Oral Oncol.* 1999 Jul; 35(4):425-30.

Longhurst CM, Jennings LK. Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol Life Sci.* 1998 Jun; 54(6):514-26.

Maness PF, Schachner M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nature Neurosci.* 2007; 10, 19–26.

Manolidis S, Donald PJ. Malignant mucosal melanoma of the head and neck: review of the literature and report of 14 patients. *Cancer.* 1997; 80:1373–1386.

McGary EC, Lev DC, Bar-Eli M. Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. *Cancer Biol Ther.* 2002 Sep-Oct; 1(5): 459-465.

McGovern VJ, Cochran AJ, Van der Esch EP, Little JH, McLennan R. The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration: a revision of the 1972 Sydney classification. *Pathology.* 1986 Jan; 18 (1): 12- 21.

McLaughlin CC, Wu XC, Jemal A, Martin HJ, Roche LM, Chen VW. Incidence of noncutaneous melanomas in the U.S. *Cancer.* 2005;103:1000–7.

Meleti M, Leemans CR, De Bree R, Vescovi P, Sesenna E, Van der Waal I. Head and neck mucosal melanoma: experience with 42 patients, with emphasis on the role of postoperative radiotherapy. *Head Neck*. 2008; 30:1543–1551

Meleti M, Leemans CR, Mooi WJ, Vescovi p, van der Waal I. Oral malignant melanoma: a review of the literature. *Oral Oncology*. 2007; 43, 116– 121.

Mendenhall WM, Amdur RJ, Hinerman RW, Werning JW, Villaret DB, Mendenhall N. Head and neck mucosal melanoma. *Am J Clin Oncol*. 2005 Dec; 28(6): 626-630.

Mihajlovic M, Vlajkovic S, Jovanovic P, Stefanovic V. Primary mucosal melanomas: a comprehensive review. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012; 5(8): 739-753

Mohan M, Sukhadia VY, pai D, Bhat S. Oral malignant melanoma: systematic review of literature and report of two cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012; vol xx, no. x; p. xx

Moretti S, Martini L, Berti E, Pinzi C, Giannotti B. Adhesion molecule profile and malignancy of melanocytic lesions. *Melanoma Res*. 1993 Aug; 3(4): 235-39

Mortarini R, Anichini A. From adhesion to signalling: roles of integrins in the biology of human melanoma. *Melanoma Res*. 1993 Apr; 3(2): 87-97.

Nakashima JP, Viégas CM, Fassizoli AL, Rodrigues M, Chamon LA, Silva JH, Dias FL, Araújo CM. Postoperative adjuvant radiation therapy in the treatment of primary head and neck mucosal melanomas. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2008; 70:344–351.

Nandapalan V, Roland NJ, Helliwell TR, Williams EMI, Hamilton JW, Jones AS. Mucosal melanoma of the head and neck. *Clin Otolaryngol* 1998; 23:107–116.

Natali P, Nicotra MR, Cavaliere R, Bigotti A, Romano G, Temponi M, Ferrone S. Differential expression of intercellular adhesion molecule 1 in primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res.* 1990; 50, 1271–1278.

Natali P, Hamby CV, Felding-Habermann B, Liang B, Nicotra MR, Di Filippo F, Giannarelli D, Temponi M, Ferrone S. Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res.* 1997; 57, 1554–1560.

Nesbit M, Herlyn M. Adhesion receptors in human melanoma progression. *Invasion Metastasis.* 1994; 14:131-46.

Neto DS, Pantaleão L, de Sá BC, Landman G. Alpha-v-beta3 integrin expression in melanocytic nevi and cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol.* 2007; 34(11): 851-856.

Ohashi K, Kasuga T, Tanaka N, Enomoto S, Horiuchi J, Okada N. Malignant melanomas of the oral cavity: heterogeneity of pathological and clinical features. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992; 420(1): 43-50.

Owens JM, Roberts DB, Myers JN. The role of postoperative adjuvant radiation therapy in the treatment of mucosal melanomas of the head and neck region. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003; 129:864–868.

Panje WR, Moran WR. Melanoma of the upper aerodigestive tract: a review of 21 cases. *Head and Neck Surg.* 1986; 8:309–312.

Parichy DM, Reedy MV, Erickson CA. Regulation of melanoblast migration and differentiation. In: The pigmentary system. Norlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Oetting WS, Ortonne JP editors. 2nd Ed. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2006. p. 140-154.

Park CC, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Med Today*. 2000 Aug; 6(8): 1563-68.

Patel SG, Prasad ML, Escrig M, Singh B, Shaha AR, Kraus DH, Boyle JO, Huvos AG, Busam K, Shah JP. Primary mucosal malignant melanoma of the head and neck. *Head Neck*. 2002 Mar; 24(3): 247-57.

Patrick RJ, Fenske NA, Messina JL. Primary mucosal melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56:828-34.

Peckitt NS, Wood GA. Malignant melanoma of the oral cavity. A case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990 Aug; 70(2): 161-64.

Petitclerc E, Strömblad S, von Schalscha TL, Mitjans F, Piulats J, Montgomery AM, Cheresch DA, Brooks PC. Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res*. 1999 Jun; 59(11): 2724-30.

Postow MA, Hamid O, Carvajal RD. Mucosal Melanoma: Pathogenesis, Clinical Behavior, and Management. *Curr Oncol Rep*. 2012 Oct; 14(5): 441-448.

Prasad ML, Patel S, Hoshaw-Woodard S, Escrig M, Shah JP, Huvos AG, Busam KJ. Prognostic factors for malignant melanoma of the squamous of the head and neck. *Am J Surg Pathol*. 2002 Jul; 26(7): 883-92.

Prasad ML, Busam KJ, Patel SG, Hoshaw-Woodard S, Shah JP, Huvos AG. Clinicopathologic differences in malignant melanoma arising in oral squamous and sinonasal respiratory mucosa of the upper aerodigestive tract. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Aug; 127(8): 997-1002.

Prasad ML, Patel SG, Huvos AG, Shah JP, Busam KJ. Primary mucosal melanoma of the head and neck. A proposal for microstaging localized, stage I (lymph node-negative) tumors. *Cancer*. 2004 Apr; 100: 1657-1664.

Prota G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J Invest Dermatol*. 1980 Jul; 75(1): 122-27.

Quevedo WC Jr, Fleishmann RD. Developmental biology of mammalian melanocytes. *J Invest Dermatol*. 1980 Jul; 75(1): 116-21.

Radovic-Kovacevic V, Pekmezovic T, Adanja B, Jarebinski M, Marinkovic J, Tomin R. [Survival analysis in patients with cutaneous malignant melanoma]. *Srp Arh Celok Lek*. 1997 May-Jun; 125(5-6):132-137.

Rapidis A, Apostolidis C, Vilos G, Valsamis S. Primary malignant melanoma of the oral mucosa. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003 Oct; 61: 1132-39.

Rapini RP, Golitz LE, Greer RO, Krekorian EA, Poulson T. Primary malignant melanoma of the oral cavity: a review of 177 cases. *Cancer* 1985; 55:1543–1551.

Rathinam R e Alahari SK. Important role of integrins in the cancer biology. *Cancer Metastasis Rev*. 2010 Mar; 29(1): 223-237.

Rimoldi D, Salvi S, Liénard D, Lejeune FJ, Speiser D, Zografos L, Cerottini JC. Lack of BRAF mutations in uveal melanoma. *Cancer Res.* 2003;63:5712–5715.

Rivera RS, Nagatsuka H, Gunduz M, Cengiz B, Gunduz E, Siar CH, Tsujigiwa H, Tamamura R, Han KN, Nagai N. C-kit protein expression correlated with activating mutations in KIT gene in oral mucosal melanoma. *Virchows Arch.* 2008 Jan;452(1):27-32.

Schadendorf D, Gawlik C, Haney U, Ostmeier H, Suter L, Czarnetzki BM. Tumour progression and metastatic behaviour in vivo correlates with integrin expression on melanocytic tumours. *J Pathol.* 1993; 170(4): 429-434.

Schadendorf D, Heidel J, Gawlik C, Suter L, Czarnetzki BM. Association with clinical outcome of expression of VLA-4 in primary cutaneous malignant melanoma as well as P-selectin and E-selectin on intratumoral vessels. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87, 366–371.

Seetharamu N, Ott PA, Pavlick AC. Mucosal Melanomas: A Case-Based Review of the Literature. *Oncologist.* 2010; 15 (7): 772-781.

Seftor RE, Seftor EA, Hendrix MJ. Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 1999; 18(3): 359-375.

Sharma N. Primary oral malignant melanoma: two case reports and review of literature. *Case Rep Dent.* 2012; vol 2012 ARTICLE ID:975358

Shibuya H, Takeda M, Matsumoto S, Shibuya H, Takeda M, Matsumoto S, Hoshina M, Suzuki S, Takagi M. The efficacy of radiation therapy for a malignant melanoma in the mucosa of the upper jaw: an analytic study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 25:35–39.

Shih IM, Elder DE, Hsu MY, Herlyn M. Regulation of Mel-CAM/MUC18 expression on melanocytes of different stages of tumor progression by normal keratinocytes. *Am J Pathol.* 1994; 145(4): 837-845.

Shih IM, Speicher D, Hsu MY, Levine E, Herlyn M. Melanoma cell-cell interactions are mediated through heterophilic Mel-CAM/ligand adhesion. *Cancer Res.* 1997; 57(17): 3835-3840.

Stern SJ, Guillaumondegui OM. Mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck.* 1991; 27:13–22.

Storm FK 3rd, Eilber FR, Morton DL, Clark WH Jr. Malignant melanoma of the head and neck. *Head Neck Surg.* 1978 Nov-Dec; 1(2): 123-28.

Swart GW, Lunter PC, Kilsdonk JW, Kempen LC. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166): signaling at the divide of melanoma cell clustering and cell migration? *Cancer Metastasis Rev.* 2005 Jun; 24(2): 223-236.

Takagi M, Ishikawa G, Mori W. Primary malignant melanoma of the oral cavity in Japan. With special reference to mucosal melanosis. *Cancer.* 1974 Aug; 34(2): 358-70.

Tanaka N, Amagasa T, Iwaki H, Shioda S, Takeda M, Ohashi K Reck SF. Oral malignant melanoma in Japan. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Jul;78(1):81-90.

Tanaka N, Nagai I, Hiratsuka H, Kohama G. Oral malignant melanoma: Long-term follow up in three patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998 Apr; 27(2): 111-14.

Tanaka N, Mimura M, Ogi K, Amagasa T. Primary malignant melanoma of the oral cavity: assessment of outcome from the clinical records of 35 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Dec; 33(8): 761-765.

Temam S, Mamelie G, Marandas P, Wibault P, Avril MF, Janot F, Julieron M, Schwaab G, Lubinski B. Postoperative radiotherapy for primary mucosal melanoma of the head and neck. *Cancer*. 2005; 103:313–319.

Thies A, Moll I, Berger J, Wagener C, Brümmer J, Schulze HJ, Brunner G, Schumacher U. CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J Clin Oncol*. 2002 May 15; 20(10): 2530-36.

Thompson LD, Wieneke JA, Miettinen M. Sinonasal tract and nasopharyngeal melanomas: a clinicopathologic study of 115 cases with a proposed staging system. *Am J Surg Pathol*. 2003; 27: 594-611.

Ulusal BG, Karatas O, Yildiz AC, Oztan Y. Primary malignant melanoma of the maxillary gingiva. *Dermatol Surg*. 2003 Mar;29(3):304-7.

Umeda M, Shimada K. Primary malignant melanoma of the oral cavity: its histological classification and treatment. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1994 Feb; 32(1): 39-47.

van Kempen LC, van den Oord JJ, van Muijen GN, Weidle UH, Bloemers HP, Swart GW. Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol*. 2000 Mar; 156(3): 769-774.

van Kempen LC, Meier F, Egeblad M, Kersten-Niessen MJ, Garbe C, Weidle UH, Van Muijen GN, Herlyn M, Bloemers HP, Swart GW. Truncation of activated leukocyte cell adhesion molecule: a gateway to melanoma metastasis. *J Invest Dermatol*. 2004 May; 122(5): 1293-301.

Weidle UH, Eggle D, Klostermann S, Swart GW. ALCAM/CD166: cancer-related issues. *Cancer Genomics Proteomics*. 2010 Sep-Oct;7(5):231-43.

Xie K, Wang Y, Huang S, Xu L, Bielenberg D, Salas T, McConkey DJ, Jiang W, Fidler IJ. Nitric oxide-mediated apoptosis of K-1735 melanoma cells is associated with downregulation of Bcl-2. *Oncogene*. 1997; 15(7): 771-779.

Yoshinaga IG, Vink J, Dekker SK, Mihm MC Jr, Byers HR. Role of alpha 3 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins in melanoma cell migration. *Melanoma Res*. 1993; 3(6): 435-441.

Zabouo G, Imbert A, Jacquemier J, Finetti P, Moreau T, Esterni B, Birnbaum D, Bertucci F, Chabannon C. CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*. 2009, 11 (1): R1.

Zhu N, Eves PC, Katerinaki E, Szabo M, Morandini R, Ghanem G, Lorigan P, MacNeil S, Haycock JW. Melanoma cell attachment, invasion, and integrin expression is upregulated by tumor necrosis factor alpha and suppressed by alpha melanocyte stimulating hormone. *J Invest Dermatol*. 2002; 119(5): 1165-1171.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Termo de aprovação do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
(CAPPesq)

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 1105/06

Título: Melanomas orais: estudo morfológico e análise imuno-histoquímica de marcadores tumorais e moléculas de adesão por meio de "Tissue Microarray"

Pesquisador Responsável: Silvia Vanessa Lourenço

Pesquisador Executante: a mesma

Departamento: Dermatologia

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA ad-referendum** em 29/03/2011, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• Carta datada de 07/02/12:

- Inclusão da pós-graduanda Sheyla Batista Bologna como pesquisadora executante no sub-projeto intitulado: "Melanoma primário da mucosa oral: estudo dos aspectos clinico-patológicos e da expressão das imunoglobulinas e integrinas em 35 casos organizados em "tissue microarray"
- Relatório de andamento do estudo.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 02 de Abril de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

APÊNDICE 2

Artigo publicado na revista The American Journal of Dermatopathology em
Julho de 2013.

Adhesion Molecules in Primary Oral Mucosal Melanoma: Study of Claudins, Integrins and Immunoglobulins in a Series of 35 Cases

Sheyla Batista Bologna, DDS,*† Marcello Menta S. Nico, MD, PhD,*† Ricardo Hsieh, DDS, PhD,*†
Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo, PhD,‡ Marcilei E. Buim, PhD,‡
Juliana Dumet Fernandes, MD, PhD,§ Martin Sanguenza, MD,¶ Fernando Augusto Soares, MD, PhD,‡||
and Silvia Vanessa Lourenço, DDS, PhD*†||

Abstract: Primary oral mucosal melanoma is a rare aggressive tumor. Recent studies have demonstrated a correlation between increased tumor invasion and the metastatic phenotype and altered adhesion molecule expression profiles. The present study analyzed the expression of integrins, claudins, and immunoglobulin-like adhesion molecules in oral mucosal melanomas and correlated results with clinical parameters. Immunohistochemical analyses of the expression patterns of these molecules were performed on thirty-five cases of primary oral mucosal melanomas organized in a tissue microarray. The results were correlated with clinical and histological features of the cohort. A number of integrin subunits were negative and this was related with vascular invasion. Positivity of integrin beta-3 and CD166 (activated leukocyte cell adhesion molecule) was statistically associated with extensive vascular invasion ($P < 0.05$). Lower expression of CD54 (intercellular cell adhesion molecule) was associated with cases with extensive necrosis. Most cases with metastatic disease were negative for CD66 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule). Several subunits of claudins were negative and, although not statistically significant, this lack of expression was partially associated with histological factors of poor prognosis. Altered patterns of adhesion molecule expression, mainly integrins and immunoglobulin-like proteins, may participate in the pathogenesis and outcome of oral mucosal melanomas.

Key Words: adhesion molecules, oral melanoma, tissue microarray
(*Am J Dermatopathol* 2013;35:541–554)

From the *Department of Dermatology, Medical School, University of São Paulo, São Paulo-SP, Brazil; †Laboratory of Immunopathology, Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo, São Paulo-SP, Brazil; ‡Department of Pathology, Hospital A.C. Camargo, São Paulo, Brazil; §Department of Dermatology, Medical School, University Federal of Bahia, Salvador, Brazil; ¶Department of Pathology, Hospital Obrero, La Paz, Bolivia; and ||Department of Pathology, Dental School, University of São Paulo, São Paulo-SP, Brazil.

The authors have no funding or conflicts of interest to disclose.

Reprints: Silvia Vanessa Lourenço, DDS, PhD, Disciplina de Patologia Geral, Departamento de Estomatologia, Faculdade de Odontologia da USP, Av Prof Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária, São Paulo, CEP: 05508-000, SP, Brazil; (e-mail: silvalourenco@usp.br).

© 2013 Lippincott Williams & Wilkins

INTRODUCTION

Primary mucosal melanoma of the head and neck (HNMM) comprises 0.7% of all malignant melanomas. To our knowledge, unlike cutaneous melanoma, little is known about the etiologic factors or race predilection associated with HNMM; the median age of HNMM patients is typically 20 years older than for patients who develop its cutaneous counterpart.^{1,2} Mucosal melanomas are aggressive tumors, with a 5-year survival rate ranging from 0% to 55%.^{1,3–11}

Genetic and molecular mechanisms involved in the development of cutaneous melanomas have recently been published. These include alterations in several signaling pathways that mediate primary melanocyte clonal alteration, such as proliferative, apoptosis, and senescence pathways.^{12,13} Additionally, alterations in the interaction of melanoma cells with keratinocytes and fibroblasts, likely due to changes in adhesion molecule expression, promote the survival and proliferation of melanoma cells outside of their typical epidermal location.¹⁴

Studies have demonstrated that abnormal expression of cell adhesion molecules (CAMs) is a contributing factor to tumor development and progression. These CAMs include members of several gene families of adhesion molecules, such as integrins, cadherins, tight junction proteins, and molecules belonging to the immunoglobulin gene superfamily.^{15,16} Integrins comprise a glycoprotein family that function as heterodimeric receptors for extracellular matrix (ECM) molecules. There are 18 alpha subunits and 8 beta subunits that combine to form 24 different integrins. Each pair of alpha subunit and beta subunit has a defined set of extracellular ligands.¹⁷ Integrins are involved in adhesive function, and they provide traction for cell motility and influence the regulation of cell shape, gene transcription, and migration.¹⁸ Many studies have shown that integrin expression is frequently altered during malignant transformation. Furthermore, upregulation of integrin expression is associated with the acquisition of a metastatic phenotype.¹⁹

Proteins located in adhering junctions (mainly cadherins) and in tight junctions (mainly claudins) and immunoglobulin-like CAMs (Ig-CAMs) predominantly mediate cell–cell adhesion.²⁰ Claudins are a group of transmembrane proteins that have 2 main following functions: a barrier that regulates the passage of ions,

water, macromolecules, and cells and as a fence that maintains cell polarity.^{21,22} Alterations, mostly reductions, in the expression levels of claudins have been correlated with increased tumor invasiveness and a metastatic phenotype.^{23–30} These findings suggest that, in some solid neoplasms, claudins play a role in tumor progression and dissemination.²² In cutaneous melanomas, Cohn et al²² reported that alterations in claudin expression were related to metastatic events.

Ig-CAMs are cell surface glycoproteins that contain a variable number of immunoglobulin-like loops in their extracellular domain. They promote Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent adhesion, and their cytoplasmic tail interacts with actin, ankyrins, and spectrin.²⁰ Though normal melanocytes express few Ig-CAMs, cutaneous melanoma cells overexpress Ig-CAMs including melanoma cell adhesion molecule (MCAM, also known as Mel-CAM, MUC18, or CD146), activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM or CD166), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1 or CD54), L1 cell adhesion molecule (L1-CAM or CD171), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1 or CD106), and carcinoembryonic antigen–related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1 or CD66a).¹⁶ Additionally, both overexpression and downregulation of Ig-CAMs have been associated with metastasis in malignant melanoma. Specifically, the loss of VCAM-1 and upregulation of ICAM-1 and MUC18 have been linked to the development of metastases in cutaneous malignant melanoma.^{31–35} However, in primary oral mucosal melanoma, the role of adhesion molecules and their expression patterns and relationship with clinical parameters remain to be determined.

Our study investigated the pattern of expression of integrins, claudins, and Ig-CAMs in 35 cases of primary oral mucosal melanoma using tissue microarrays (TMAs) and associated these expression patterns with clinical and histopathological parameters.

MATERIAL AND METHODS

The medical records of 35 patients diagnosed with oral mucosal melanoma over the past 30 years from 3 major Hospitals in Brazil and Bolivia (Hospital das Clínicas, Medical School, University of São Paulo and Hospital A.C. Camargo, São Paulo, Brazil; Hospital Obrero, La Paz, Bolivia) were reviewed. The clinical features, such as gender, age, tumor site, presence of metastasis, treatment, and outcome, of this cohort were previously reported by Lourenço et al.³⁶ This study was approved by the Local Ethical Committee.

The histopathology characteristics of all cases were re-examined. Diagnosis of primary oral mucosal melanoma was based on the clinical information available, which excluded history of melanoma at another site or evidence of metastatic melanoma from an extramucosal site. Confirmation of the diagnosis was established with a histopathological exam of the archived material. Pathology review of melanoma tissue slides was performed to determine if in situ melanoma or a dominant tumor mass was present. However, because the diagnosis was established using clinical–pathological measures, failure to detect an in situ melanoma component did not result in study exclusion. Pathological parameters evaluated included anatomic site, level of invasion, and thickness of the tumor (when possible), cytology, ulceration, necrosis, vascular invasion, and perineural involvement of the tumor.³⁶

Tissue Microarray

Paraffin-embedded archived tissues from 34 cases of oral melanoma, of the 35 reviewed, were used in this phase of the study. Tissue blocks were initially selected based on the amount of material they contained. The presence of oral melanoma was evaluated in hematoxylin and eosin–stained sections. The areas used for the construction of the TMAs were marked on the slide and the donor block. The tissues corresponding to selected areas were sampled using a manual

TABLE 1. Primary Serum, Clones, Manufacturer, Title, and Antigen Retrieval

Primary Serum	Clone	Manufacturer	Title	Antigen Retrieval
Claudin-1	Rabbit polyclonal	Invitrogen	1:200	Citrate pH 6.0
Claudin-3	Rabbit polyclonal	Labvision	1:200	Citrate pH 6.0
Claudin-4	Rabbit polyclonal	Labvision	1:100	Citrate pH 6.0
Claudin-5	Rabbit polyclonal	Labvision	1:500	Citrate pH 6.0
Claudin-7	Rabbit polyclonal	Invitrogen	1:200	Citrate pH 6.0
Claudin-11	Rabbit polyclonal	Labvision	1:200	Citrate pH 6.0
ICAM/CD54	23G12	Vector	1:50	Citrate pH 6.0
CEACAM/CD66	29H2	Vector	1:50	Citrate pH 6.0
MELCAM/CD146	N1238	Vector	1:50	Citrate pH 6.0
ALCAM/CD166	MOG/07	Vector	1:50	Citrate pH 6.0
Integrin alpha 2	10G11	Chemicon	1:30	Pepsin 1%, 37°C, 30 min
Integrin alpha 3	P1B5	Chemicon	1:30	Pepsin 1%, 37°C, 30 min
Integrin alpha 4	P1H4	Chemicon	1:50	Pepsin 1%, 37°C, 30 min
Integrin alpha 5	P1D6	Chemicon	1:30	Pepsin 1%, 37°C, 30 min
Integrin alpha 6	NKI-G0H3	Chemicon	1:30	Pepsin 1%, 37°C, 30 min
Integrin alpha v	VNR147	Chemicon	1:50	Pepsin 1%, 37°C, 30 min
Integrin beta 1	P4G11	Chemicon	1:50	Pepsin 1%, 37°C, 30 min
Integrin beta 3	SAP	Chemicon	1:30	Pepsin 1%, 37°C, 30 min
Integrin beta 4	ASC-3	Chemicon	1:50	Pepsin 1%, 37°C, 30 min

TABLE 2. Summary of Clinical Information and Histopathological Analysis of 35 Cases of Oral Mucosal Melanoma

			Values	
			n	%
Clinical information	Age (yrs)	0–20	1	2.85
		21–40	2	5.71
		41–60	14	40
		61–80	13	37.14
		>80	5	14.28
	Sex	Male	18	51.43
		Female	17	48.57
	Race	White	21	75
		Non-white	7	25
	Site of lesions	Palate/upper alveolar ridge	25	71.42
		Retromolar trigone/floor of mouth	3	8.57
		Labial mucosa	3	8.57
		Buccal mucosa/vestibular mucosa	2	5.71
		Lateral border of tongue	1	2.86
Histopathological analysis	Level	Not informed	1	2.86
		1	1	2.94
		2	5	14.71
		3	28	82.35
	Melanin	Not evaluated	1	2.94
		Absent	1	2.86
	Necrosis	Yes	34	97.14
		No	19	54.29
	Vascular invasion	Yes	16	45.71
		No	13	37.14
		Not evaluated	2	2.24
	Perineural invasion	Yes	26	74.29
		No	9	25.71

arraying instrument (Manual Tissue Arrayer 1, Beecher Instruments, Sun Prairie, WI). The sampling consisted of 2 malignant cores from different areas of the tumor, coordinately placed in the array. Separate samples of normal skin and normal oral mucosa were used as controls. After the array was completed, TMA blocks were sectioned in to 4- μ m sections. One section was stained with hematoxylin and eosin to determine the presence of neoplastic structures and 2 other sections, 40- μ m from each other, were used for the immunohistochemical study of integrins, Ig-CAMs, and claudins.

Immunohistochemistry

Each of the 4- μ m serial sections were rehydrated and incubated in 3% aqueous hydrogen peroxide for 30 minutes to quench endogenous peroxidase activity. Sections were incubated with 1% bovine serum albumin and 5% fetal calf serum in Tris-HCl, pH 7.4, for 60 minutes at room temperature to block nonspecific binding of subsequent reagents. Antigen retrieval was then performed, followed by incubation

overnight with the anticlaudin primary serum. Details of the antigen retrieval methods and primary antibodies clones, source, and title are described in Table 1.

All subsequent procedures were each preceded by a 5-minute incubation with 1% Tween-20 in TRIS, pH 7.4. After incubation with primary serum, the TMA sections were incubated with En Vision Phosphatase (DakoCytomation) for 30 minutes. Then, sections were incubated with the Liquid Permanent Red substrate-chromogen (DakoCytomation) for 20 minutes. The specimens were next lightly counterstained using Mayer hematoxylin, dehydrated, and mounted with a glass cover slip and xylene-based mountant. Negative controls were achieved by substituting primary specific antibodies with nonimmune serum, and internal positive controls were based on the primary serum manufacturer recommendation. All immunohistochemical reactions were carried out in duplicates. The results were analyzed using a conventional optical microscope equipped with a digital camera for image collection.

Semiquantitative analyses of the results determined the area of staining in each core. The following scoring system was used: (0) for less than 1% positivity; (1) for positivity detected in up to 30% of the total area of the core; and (2) for positivity detected in more than 30% of the core area. All cores were analyzed using magnification $\times 400$.

Statistical Analysis

The semiquantitative claudin expression data was analyzed and compared with classic clinical histopathological parameters for oral melanoma as follows: histological grade, vascular and perineural infiltration, and clinical stages of disease. Correlations between adhesion molecule expression and tumor characteristics (histological grade, vascular and perineural infiltration, and clinical stages of the disease) were assessed using the χ^2 test. All *P* values were based on 2-sample statistical analyses, and *P* < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS version 1.5.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Clinical data are described in Table 2.¹² In 10 cases (29.41%), local recurrence was reported, but clinical information was not available for these patients. Metastasis occurred in 21 patients (61.76%), mainly to the brain, liver, and lungs.

Morphological Results

Histological review of the 35 primary oral melanoma cases revealed that most cases were diagnosed as a level-3 invasion (28 cases—80%). Level-2 tumor invasion was observed in 5 tumors (14.28%), and in 1 case, the depth of invasion could not be evaluated. Thirty-four tumors were melanotic; 1 case was amelanotic. The tumors displayed a varied degree of architectural and cell pleomorphisms. The cellular composition differed, 16 (45.71%) were monomorphous and 17 (48%) were polymorphous. Necrosis was found in 16 cases (45.71%) and ranged from focal to extensive. In 1 case, necrosis was so extensive that cellular composition was not evaluated. Vascular

FIGURE 1. Claudins expression in primary oral mucosal melanoma. A, Claudin-1 immunoexpression surrounding cytoplasmic membrane of neoplastic melanocytes (original magnification $\times 400$). B and C, Claudin-3: in B, presence of claudin-3 surrounding the cell membrane of intraepithelial neoplastic melanocytes; in C, rare cases with intense claudin-3 positivity in deeply invasive neoplastic melanocytes (original magnification $\times 400$). D and E, Claudin-4: in D, rare cases positive for this protein; in E, neoplastic melanocytes are negative for claudin-4. Notice positivity for this protein in the mucosal epithelium (original magnification $\times 400$). F and G, Neoplastic melanocytes positive for claudin-5 both within mucosal epithelium (F) and in invasive tumors (histological level 3) (G) (original magnification $\times 400$). H and I, Claudin-7: in H, weak positivity for claudin-7 in a melanoma level 3; in most melanoma cases, claudin-7 was negative (original magnification $\times 400$). J and K, In J, example of a case positive for this protein; in K, example of cases negative for claudin-11 (most cases) (original magnification $\times 400$).

FIGURE 2. Integrins expression in primary oral mucosal melanoma. A, alpha3: positivity in neoplastic melanocytes (original magnification $\times 400$). B and C, alpha4: presence of positive neoplastic melanocytes both at epithelial/lamina propria junction (B) and in deeply invasive cells (C) (original magnification $\times 400$). D and E, alpha5: presence of the protein in nests and sheets of neoplastic melanocytes (original magnification $\times 400$). F, beta3: nests of neoplastic melanocytes positive for integrin beta3 (original magnification $\times 400$). G, beta3: positive neoplastic melanocytes close to blood vessels (original magnification $\times 400$). H, beta3: positive sheets of neoplastic melanocytes present at the epithelial junction (original magnification $\times 400$). I, beta4: rare neoplastic melanocytes positive for integrin beta4 (original magnification $\times 400$).

invasion was observed in 20 of 35 (57.14%) cases, and perineural invasion was detected in 9 of 35 (25.71%) cases. Statistical analyses demonstrated that vascular invasion in 20 cases (57.14%) differed significantly from the remaining 15 cases of oral mucosa melanoma.

Immunohistochemistry

The expression of claudins, integrins, and Ig-CAMs was variable and mostly localized to the membrane of positive cells. All of the molecules evaluated in this study were present in the positive control samples (normal skin and oral mucosa).

FIGURE 3. Immunoglobulins expression in primary oral mucosal melanomas. A and B, CD54: example of primary oral mucosal melanomas positive for this protein (original magnification $\times 400$). C and D, CD54: positive neoplastic melanocytes nests present at epithelial/lamina propria junction (original magnification $\times 400$). E and F, CD66a: in E, rare neoplastic melanocytes positive for the protein; in F, expression of CD66 in sheets of deeply invasive neoplastic melanocytes (original magnification $\times 400$). G and H, CD146: expression of the protein in nests (G) and sheets (H) of neoplastic melanocytes (original magnification $\times 400$). I and J, CD166: nests of neoplastic melanocytes positive for the protein next to the epithelial junction (I); in J, positivity for CD166 in deeply invasive neoplastic melanocytes (original magnification $\times 400$).

Immunohistochemical analyses demonstrated that 18% (6 cases) were positive for claudin 1, 100% were claudin 3 positive, 4% (1 case) were claudin 4 positive, 31% (10 cases) were positive for claudin 5, 27% (9 cases) were claudin 7 positive, and 29% (10 cases) were claudin 11

positive. All samples were negative for expression of the integrins alpha-2, alpha-6, alpha-V, and beta-1, although they were present in the positive controls (normal skin and oral mucosa). All cases that displayed an in situ component were consistently positive for the subunit, alpha-3; specifically,

TABLE 3. Association Between the Expression of Claudins and the Clinical–Pathological Characteristics of Primary Oral Melanoma Cases

	No. Cases	Claudin 1			Claudin 3			Claudin 4		
		Negative (%)	Positive (%)	P	Negative (%)	Positive (%)	P	Negative (%)	Positive (%)	P
Sex										
Female	17	15 (88)	02 (12)	0.656	—	16 (100)	—	17 (100)	0	0.469
Male	17	13 (76)	04 (23)		—	16 (100)		14 (93)	1 (7)	
Recurrence										
No	14	12 (85)	02 (15)	1.00	—	04 (100)	—	13 (100)	00	0.435
Yes	10	08 (80)	02 (20)	—	10 (100)		09 (90)	01 (10)		
Metastasis										
Absent	02	02 (100)	00	1.00	—	02 (100)	—	02 (100)	00	—
Present	21	17 (81)	04 (19)	—	21 (100)		20 (100)	00		
Histological grade										
2	05	04 (80)	01 (20)	0.556	—	04 (100)	—	04 (100)	00	1.00
3	28	23 (82)	05 (18)	—	27 (100)		26 (96)	01 (4)		
Cell type										
Monomorphic	16	15 (94)	01 (6)	0.175	—	14 (100)	—	14 (93)	01 (7)	0.484
Polymorphic	17	12 (71)	05 (29)	—	17 (100)		16 (100)	0		
Necrosis										
Absent	19	17 (90)	02 (10)	0.174	—	17 (100)	—	16 (94)	01 (6)	1.00
Present	15	10 (67)	05 (33)	—	12 (100)		12 (100)	00		
Vascular invasion										
Absent	12	11 (92)	01 (8)	0.370	—	10 (100)	—	09 (90)	01 (10)	0.333
Present	20	15 (75)	05 (25)	—	20 (100)		20 (100)	00		
Perineural invasion										
Absent	23	19 (83)	04 (17)	1.00	—	21 (100)	—	20 (95)	01 (5)	1.00
Present	09	07 (78)	02 (22)	—	09 (100)		09 (100)	00		
Melanin										
Absent	10	07 (70)	03 (30)	0.336	—	09 (100)	—	09 (100)	00	1.00
Present	20	20 (87)	03 (13)	—	22 (100)		21 (95.5)	01 (4.5)		
		Claudin 5			Claudin 7			Claudin 11		
		Negative (%)	Positive (%)	P	Negative (%)	Positive (%)	P	Negative (%)	Positive (%)	P
Sex										
Female	10 (62)	06 (38)	0.446	10 (59)	07 (41)	0.118	11(65)	06 (35)	0.708	
Male	12 (75)	04 (25)		14 (87)	02 (12)		13 (77)	04 (23)		
Recurrence										
No	10 (71)	04 (28)	0.643	09 (70)	04 (30)	0.349	10 (72)	04 (28)	0.439	
Yes	07 (70)	03 (30)	05 (50)	05 (50)	06 (60)		04 (40)			
Metastasis										
Absent	02 (100)	00	1.00	02 (100)	00	0.515	02 (100)	00	1.00	
Present	14 (67)	07 (33)	12 (60)	08 (40)	14 (67)		07 (33)			
Histological grade										
2	03 (75)	01 (25)	0.416	04 (100)	00	1.00	04 (80)	01 (20)	1.00	
3	18 (67)	09 (33)	20 (71)	08 (29)	19 (68)		09 (32)			
Cell type										
Monomorphic	10 (67)	05 (33)	0.901	12 (75)	04 (25)	1.00	10 (63)	06 (37)	0.383	
Polymorphic	11 (69)	05 (31)	12 (75)	04 (25)	13 (77)		04 (23)			
Necrosis										
Absent	12 (71)	05 (30)	1.00	14 (78)	04 (22)	0.255	13 (68)	06 (32)	0.695	
Present	09 (75)	03 (25)	07 (58)	05 (42)	9 (75)		05 (33)			
Vascular invasion										
Absent	08 (73)	03 (27)	0.592	08 (73)	03 (27)	0.890	07 (58)	05 (42)	0.076	
Present	12 (63)	07 (37)	15 (75)	05 (25)	16 (80)		03 (25)			

(continued on next page)

TABLE 3. (Continued) Association Between the Expression of Claudins and the Clinical–Pathological Characteristics of Primary Oral Melanoma Cases

	Claudin 5			Claudin 7			Claudin 11		
	Negative (%)	Positive (%)	P	Negative (%)	Positive (%)	P	Negative (%)	Positive (%)	P
Perineural invasion									
Absent	14 (67)	07 (33)	1.00	17 (77)	05 (23)	0.660	15 (65)	08 (35)	0.681
Present	06 (67)	03 (33)		06 (67)	03 (33)		07 (78)	02 (22)	
Melanin									
Absent	07 (70)	03 (30)	0.853	07 (70)	03 (30)	0.874	09 (90)	01 (10)	0.094
Present	14 (67)	07 (33)		16 (73)	06 (27)		14 (61)	09 (39)	

The *P* value: exact Fisher test.

94% of all samples examined (30 cases) were positive for alpha-3. In contrast, 66% of cases (21 patients) were alpha-4 positive and 85% (29 cases) were positive for integrin alpha-5. Additionally, 54.5% of samples (19 cases) were integrin beta-3 positive, and only 28% (9 cases) were positive for integrin beta-4. ICAM-1 was negative in most cases examined (53%, 17 cases). In melanoma cases, that an in situ component was detected, focal positivity for ICAM-1 was observed.

For the immunoglobulin family, CD146 and CD166 expression was also more intense for in situ melanomas and tumors with a compact organoid architecture; CD146 was absent in 50% of cases (16 cases), and 28% of cases (9 cases) lacked CD166 expression. Finally, 69% of samples (20 cases) were negative for CD66.

These results are illustrated in Figures 1–3, and the statistical data are in Tables 3–5.

DISCUSSION

Our study investigated the expression of adhesion molecules and demonstrated that, in most cases analyzed, these molecules were altered in primary oral mucosal melanomas. Loss of adhesion between cells and ECM and of intercellular adhesion, in general, is a process that enables invasion and metastases. Changes in adhesion allow tumor cells to break off from the original mass and migrate to distant sites via the circulatory system.

Under normal circumstances, melanocyte–keratinocyte adhesion is mediated by various of adhesion molecules. The ability of cells to adhere to ECM proteins is essential for tissue organization and cell migration to different micro-environments, exposing cells to varied sources of signaling molecules, which often provides a survival advantage for neoplastic cells. Integrins often facilitate the neoplastic cell invasion of secondary tissues via migration through the ECM.^{16,37}

In this present study, although several steps were taken to optimize anti-integrin antibody binding and detection for immunohistochemical analyses, none of the patient samples examined were positive of integrin beta-1. However, samples did express integrins alpha-3, alpha-4, and alpha-5, which usually form heterodimers with the integrin beta-1. Integrins alpha-2, alpha-3, and alpha-4 have been reported to be overexpressed in cutaneous melanomas^{19,38}; this was also observed in our subjects. Alpha-4 integrin is associated with

accumulation of neoplastic cells, and alpha-3 is associated with increased tumor cell mobility.^{39,40} There is a possibility that, in cases of oral mucosal melanoma, these integrins might form heterodimers with other beta subunits; this would explain the lack of beta-1 staining. Alternatively, integrins alpha-3, alpha-4, and alpha-5 may not be functional. Integrin alpha subunits are usually synthesized in excess and stored in cells but are not active unless associated with a beta integrin,⁴¹ and functionality cannot be assessed using immunochemistry.

In general, samples were also negative for integrins beta-3 and beta-4, which can also form heterodimers with alpha subunits. These results support the hypothesis that integrins are greatly altered in oral mucosa melanomas and these changes, which are dependent on the microenvironment and ECM, may be distinct from those observed in cutaneous melanomas. Several studies have reported that, in cutaneous melanomas, integrins are associated with tumor growth and metastasis and the most common integrin reported in association with cutaneous melanomas is the heterodimer alpha-V/beta-3.^{42–46} Interactions between alpha-V/beta-3 and the ECM promote cell adhesion and migration. In melanoma, the expression of the alpha-V subunit does not change greatly, but the beta-3 subunit is widely positive in cases where tumor growth is predominantly vertical.^{43,47–49} In fact, integrin beta-3 expression is considered as a prognostic marker and therapeutic target for cutaneous melanomas.⁵⁰ However, in our study, 43% of cases (15 cases) were negative for integrin beta-3, highlighting the peculiarities of the tumor microenvironment of primary melanoma of the oral mucosa. Neto et al⁵¹ investigated the expression of integrin alpha-V/beta-3 in melanocytic nevi and cutaneous melanomas and demonstrated that, regardless of the level of invasion or stage of growth, receptor expression did not change; this suggested that integrin alpha-V/beta-3 cannot be considered sensitive enough to be used as a prognostic marker.

Most studies that have concluded that integrin alpha-V/beta-3 is related to tumor progression and metastasis were performed using in vitro systems and experimental animal models. These models may display a different cell behavior in comparison to what occurs in humans. Nevertheless, experimental studies have provided significant advances in understanding the biology of melanoma and demonstrated that integrin alpha-V/beta-3 can also influence angiogenesis and metastasis of melanoma through the regulation of metalloproteinases (MMP), such as MMP-2, and other cell adhesion

TABLE 4. Association Between the Expression of Integrins and the Clinical–Pathological Characteristics of Primary Oral Melanoma Cases

	Number of Cases	Alpha3			Alpha4			Alpha5		
		Negative (%)	Positive (%)	P	Negative (%)	Positive (%)	P	Negative (%)	Positive (%)	P
Sex										
Female	17	02 (12)	15 (88)	0.498	06 (35)	11 (65)	0.728	02 (12)	15 (88)	0.350
Male	16	00 (0)	12 (100)		05 (42)	07 (58)		03 (25)	09 (75)	
Recurrence										
No	14	01 (8)	11 (92)	1.00	05 (36)	09 (64)	1.00	02 (14)	12 (86)	1.00
Yes	10	00 (0)	10 (100)		03 (30)	07 (70)		02 (20)	08 (80)	
Metastasis										
Absent	02	00 (0)	02 (100)	1.00	01 (50)	01 (50)	0.526	00 (0)	02 (100)	1.00
Present	21	01 (5)	19 (95)		06 (29)	15 (71)		03 (14)	18 (86)	
Histological grade										
2	05	00 (0)	03 (100)	1.00	02 (50)	02 (50)	0.601	02 (40)	03 (60)	0.155
3	28	02 (7)	93 (93)		09 (32)	18 (68)		3 (11)	25 (89)	
Cell type										
Monomorphic	16	02 (13)	13 (87)	0.226	05 (33)	10 (67)	0.809	01 (6)	15 (94)	0.335
Polymorphic	17	00 16	(100)		06 (37.5)	10 (62.5)		04 (23.5)	13 (76.5)	
Necrosis										
Absent	19	02 (12)	15 (88)	0.498	06 (35)	11(65)	0.728	02 (10.5)	17 (89.5)	0.350
Present	15	00 (0)	12 (100)		05 (42)	07 (58)		03 (25)	09 (75)	
Vascular invasion										
Absent	12	02 (20)	08 (80)	0.130	04 (36)	07 (64)	1.00	03 (25)	09 (75)	0.338
Present	20	00	20 (100)		07 (37)	12 (63)		02 (10)	18 (90)	
Perineural invasion										
Absent	23	02 (9.5)	19 (90.5)	1.00	08 (38)	13 (62)	1.00	03 (13)	20 (87)	0.604
Present	09	00	09 (100)		03 (33)	06 (67)		02 (22)	07 (78)	
Melanin										
Absent	10	01 (10)	09 (90)	1.00	04 (40)	06 (60)	0.717	02 (20)	08 (80)	0.627
Present	20	01 (5)	20 (95)		07 (33)	14 (67)		03 (13)	20 (87)	
		Beta3			Beta 4					
		Negative (%)	Positive (%)	P	Negative (%)	Positive (%)	P			
Sex										
Female		09 (53)	08 (47)	0.654	11 (69)	05 (31)	1.00			
Male		05 (42)	07 (58)		12 (75)	04 (25)				
Recurrence										
No		07 (50)	07 (50)	0.327	10 (71)	04 (29)	1.00			
Yes		03 (30)	07 (70)		07 (70)	03 (30)				
Metastasis										
Absent		01 (50)	01 (50)	1.00	02 (100)	00 (0)	0.526			
Present		08 (38)	13 (62)		13 (62)	08 (38)				
Histological grade										
2		04 (80)	01 (20)	0.161	03 (75)	01 (25)	0.600			
3		11 (41)	16 (59)		20 (74)	07 (26)				
Cell type										
Monomorphic		09 (56)	07 (44)	0.288	12 (80)	03 (20)	0.685			
Polymorphic		06 (37.5)	10 (76.5)		11 (69)	05 (31)				
Necrosis										
Absent		09 (50)	09 (50)	0.654	12 (71)	05 (29)	0.822			
Present		05 (42)	07 (58)		08 (67)	04 (33)				
Vascular invasion										
Absent		08 (67)	04 (33)	0.056	09 (82)	02 (18)	0.677			
Present		06 (32)	13 (68)		13 (68)	06 (32)				

(continued on next page)

TABLE 4. (Continued) Association Between the Expression of Integrins and the Clinical–Pathological Characteristics of Primary Oral Melanoma Cases

	Beta3			Beta 4		
	Negative (%)	Positive (%)	<i>P</i>	Negative (%)	Positive (%)	<i>P</i>
Perineural invasion						
Absent	11 (50)	11 (50)	0.456	16 (76)	05 (24)	0.666
Present	03 (33)	06 (67)		06 (67)	03 (33)	
Melanin						
Absent	04 (40)	06 (60)	0.773	05 (50)	05 (50)	0.076
Present	10 (45.5)	12 (54.5)		17 (81)	04 (19)	

The *P* value: exact Fisher test.

signaling pathway components such as integrin-linked kinase, extracellular-related kinase, and mitogen-activated protein kinase.⁴⁶ Other reports have also demonstrated that integrin beta-4 is weakly expressed in melanomas, but such studies in cutaneous melanoma remain limited.⁵² However, our current results corroborate these published findings, given that we observed that 72% of the cases (23 cases) we examined were negative for beta-4 integrin expression.

In the context of melanoma cell adhesion, tight junctions are also important.¹⁶ We found that several claudins, which are critical components of tight junctions, were consistently negative in primary oral mucosa melanoma. However, the role of claudins in melanoma is still unclear and very few studies have addressed this issue. Cohn et al²² demonstrated that claudin-1 was significantly downregulated in skin melanomas and suggested that this phenomenon was related to the acquisition of a metastatic phenotype in this type of melanoma. Our results agree with the findings reported by Cohn et al,²² and provide additional information regarding a wider range of claudins. Claudin-1 was only locally positive, or absent, in 81.8% of cases (27 cases) that were classified histologically as level 1 and 2; among those 27 cases, 87.5% (17 cases) developed metastatic disease. However, the development of metastatic melanoma did not statistically significantly differ between claudin-1–positive and claudin-1–negative cases.

Among other claudin subunits that were partially of totally negative, claudin-11 displayed an important correlation, although not statistically significant, with increased vascular invasion (*P* = 0.076). Lack of claudin-11 in melanoma with a histological grade of 2 or 3 was especially relevant as 69.9% of all samples (23 cases) were negative for this claudin subunit, though this was not statistically significant. Claudin-11 may play an important role in the complex mechanisms of tumor dissemination as follows: 87% of samples (14 cases) negative for claudin-11 also presented a metastasis or secondary tumor mass. Agarwal et al. demonstrated that, in gastric cancer cells, claudin-11 was silenced via hypermethylation of its promoter region, and this contributed to increased tumor cell motility and invasiveness. This may also occur in melanomas of the oral mucosa; however, further studies are required to identify methods for understanding this mechanism, discover new tools to target this epigenetic phenomenon, and to develop new therapeutic modalities.⁵³

Notably, in melanoma of the oral mucosa, claudin expression was predominantly cytoplasmic rather than on the

cell membrane, which was similar to the findings reported by Cohn et al.²² This expression pattern may represent a final alteration in the tight junctions in melanoma, but further studies are necessary to better understand these results. Additionally, Matsuda et al⁵⁴ also reported cytoplasmic internalization of adhesion molecules during cellular movement, and this may partially explain the aggressive behavior of some melanomas. More recently, increased levels of cytoplasmic claudin-1 were correlated with protein kinase C and protein kinase A phosphorylation, which impacted subcellular localization of the protein in melanoma cells and increased secretion and activation of MMP-2, resulting in increased cell motility and melanoma progression.^{55,56}

Recent studies have reported a decrease in the expression of claudins in many types of solid tumors, such as ductal carcinoma of breast, ovarian carcinomas, and pancreatic carcinoma.^{25,28–30} Studies by our group of squamous cell carcinoma of the oral cavity also demonstrated a significant decrease in claudin expression, especially claudin-7. Down-regulation occurred mainly via claudin gene methylation,²⁶ and there was a correlation between reduced expression of claudins and tumor invasion and the metastatic phenotype, suggesting the fundamental importance of these proteins in tumor progression and dissemination. However, this remains to be determined for primary oral mucosal melanoma.

Unlike normal skin melanocytes, which express few Ig-CAMs, melanoma cells have been reported to upregulate the expression of CD54, CD66, CD166, and CD146. The function of these receptors in cellular adhesion is well documented, but their contribution to the phenotype of melanoma is poorly understood.¹⁶ However, contrary to published data, we observed that a large number of mucosal melanoma cases were negative for these molecules; this may reflect the peculiarities of this type of melanoma, which, due to the rarity of cases, remains ill defined.

CD146, or Mel-CAM, mediates the interaction between homologous and heterologous neoplastic melanocytes and endothelial cells.^{15,33} In melanocytic cells, this molecule is found in nevi when they migrate to the dermis; CD146 expression in malignant melanocytes seems to reach its peak in the metastatic stage and correlates with tumor thickness.^{57–59} Studies in animal models have shown that CD146 is associated with the metastatic potential of melanoma, and that CD146 facilitates extravasation and cell migration, possibly promoting new occurrences of neoplastic growth.^{15,43,60} In our study, 50%

TABLE 5. Association Between the Expression of Immunoglobulins and the Clinical–Pathological Characteristics of Primary Oral Melanoma Cases

	No. Cases	CD54			CD66		
		Negative (%)	Positive (%)	<i>P</i>	Negative (%)	Positive (%)	<i>P</i>
Sex							
Female	16	06 (37.5)	10 (62.5)	0.077	11 (69)	03 (31)	0.427
Male	16	11 (69)	05 (31)		09 (60)	06 (40)	
Recurrence							
No	14	08 (57)	06 (43)	0.527	09 (64)	05 (36)	0.418
Yes	10	05 (50)	05 (50)		07 (78)	02 (22)	
Metastasis							
Absent	02	00 (0)	02 (100)	0.178	00 (0)	02 (100)	0.091
Present	21	13 (62)	08 (38)		15 (75)	05 (25)	
Histological grade							
2	04	03 (75)	01 (25)	1.00	03 (75)	01 (25)	0.600
3	27	13 (48)	14 (52)		16 (67)	08 (33)	
Cell type							
Monomorphic	15	05 (33)	10 (67)	0.049	10 (77)	03 (23)	0.435
Polymorphic	17	11 (69)	05 (31)		09 (53)	08 (47)	
Necrosis							
Absent	17	10 (59)	07 (41)	0.070	12 (75)	04 (25)	0.268
Present	12	07 (58)	05 (42)		06 (55)	05 (45)	
Vascular invasion							
Absent	11	06 (55)	05 (45)	0.919	08 (80)	02 (20)	0.417
Present	19	10 (53)	09 (47)		11 (61)	07 (39)	
Perineural invasion							
Absent	21	13 (62)	08 (38)	0.236	14 (70)	06 (30)	1.00
Present	09	03 (33)	06 (67)		05 (62.5)	03 (37.5)	
Melanin							
Absent	10	07 (70)	03 (30)	0.242	08 (89)	01 (11)	0.120
Present	20	10 (56)	08 (44)		12 (60)	08 (40)	

	CD146			CD166		
	Negative (%)	Positive (%)	<i>P</i>	Negative (%)	Positive (%)	<i>P</i>
Sex						
Female	08 (50)	08 (50)	1.00	05 (31)	11 (69)	1.00
Male	08 (50)	08 (50)		04 (25)	12 (75)	
Recurrence						
No	06 (43)	08 (57)	0.527	04 (29)	10 (71)	0.506
Yes	05 (50)	05 (50)		02 (20)	08 (80)	
Metastasis						
Absent	01 (50)	01 (50)	1.00	00 (0)	02 (100)	1.00
Present	10 (48)	11 (52)		05 (24)	16 (76)	
Histological grade						
2	03 (75)	01 (25)	0.333	01 (25)	03 (75)	1.00
3	12 (44)	15 (56)		08 (30)	19 (70)	
Cell type						
Monomorphic	07 (47)	08 (53)	0.853	06 (40)	09 (60)	0.252
Polymorphic	08 (50)	08 (50)		03 (19)	13 (81)	
Necrosis						
Absent	09 (53)	08 (47)	0.268	07 (41)	10 (59)	0.160
Present	06 (55)	05 (45)		02 (17)	10 (83)	
Vascular invasion						
Absent	07 (64)	04 (36)	0.256	06 (55)	05 (45)	0.042
Present	08 (42)	11 (58)		03 (16)	16 (84)	

(continued on next page)

TABLE 5. (Continued) Association Between the Expression of Immunoglobulins and the Clinical–Pathological Characteristics of Primary Oral Melanoma Cases

	CD146		<i>P</i>	CD166		<i>P</i>
	Negative (%)	Positive (%)		Negative (%)	Positive (%)	
Perineural invasion						
Absent	10 (48)	11 (52)	1.00	08 (38)	13 (62)	0.210
Present	05 (56)	04 (44)		01 (11)	08 (89)	
Melanin						
Absent	05 (50)	05 (50)	0.901	03 (30)	07 (70)	0.935
Present	11 (55)	09 (45)		05 (25)	15 (70)	

The *P* value: exact Fisher test.

of oral mucosa melanoma cases were negative for CD146, and these cases were mostly thick lesions, indicative of advanced disease. However, one peculiar observation should be noted as follows: in cases where ECM components could be observed within the tumor, neoplastic cells were strongly positive, mainly at the junctional portion of the tumor. Therefore, it is possible that CD146 expression occurs in the following stages: negative in normal melanocytes, positive in the earliest possible stage (preinvasive) of tumor, and then negative, again, as disease becomes more advanced. However, this hypothesis requires further testing in animal models. We also noted that, of the 21 cases that included information on metastasis, 52% were CD146 positive. In the overall analysis, however, this expression was not statistically significant.

CD166, or ALCAM, also promotes homotypic and heterotypic intercellular adhesion and is expressed mainly in metastatic melanoma cell lines but absent in primary melanomas.⁶¹ van Kempen et al⁶² demonstrated using immunohistochemistry that the expression of CD166 or ALCAM was associated with the development and progression of melanoma. In our study, about 72% of oral mucosa melanoma cases (23 cases) displayed some degree of positivity for CD166, confirming the findings reported by van Kempen et al.⁶² This expression was statistically relevant when compared with cases with vascular invasion. Moreover, in 76% of the patients evaluated with metastatic disease, the metastatic lesion was positive for CD166, though this was not statistically significant due to the small sample number.

The expression of CD54, or ICAM-1, also correlated with the progression of melanoma and the risk of metastasis.⁴⁴ Several studies have shown that CD54 expression is increased in cutaneous melanomas compared with nevi; studies in animal models also indicated that suppression of CD54 could reduce the metastatic potential of certain strains of human melanoma.^{34,48,49,63,64} However, the role of CD54 in melanoma biology has not been defined. In our study, approximately 53% of cases (17 cases) were negative for CD54, even in advanced disease. It is important to note that CD54 is associated with cell morphology, and monomorphic tumors are predominantly CD54 positive. Therefore, the lack of CD54 expression should be studied further in mucosal melanoma, which is not related to chronic ultraviolet exposure, particularly in the context of the genetic mechanisms

promoting tumor progression and local factors, such as cytokines and growth factors.

CD66, or CEACAM, is involved in intercellular adhesion and signaling cascades. CD66 is believed to function as a tumor suppressor because a large number of tumors lose expression of this molecule. However, some types of cancer, such as lung carcinoma, may express an increased level of CD66. In cutaneous melanomas, increased expression of CD66 is associated with increased metastatic potential.⁶⁵ In our study, 69% (20 cases) of the tumors examined were negative for CD66, indicating that the expression pattern of this molecule may be tumor type dependent.

Although the results of the present work highlight important alterations in the expression of adhesion molecules in primary oral mucosal melanoma, few significant clinicopathological parameters were statistically associated with these alterations. This is likely due to the small sample size. The rarity of oral melanoma may preclude the evaluation of a larger patient cohort, and future studies will be limited to in vitro models that are currently being developed in our laboratory to investigate novel mechanisms involved in primary oral mucosa melanoma.

ACKNOWLEDGMENTS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP grants 06/56625-5 and 07/50319-2.

REFERENCES

1. Prasad ML, Patel SG, Huvos AG, et al. Primary mucosal melanoma of the head and neck. A proposal for microstaging localized, stage I (lymph node-negative) tumours. *Cancer*. 2004;100:1657–1664.
2. Chang AE, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma. A summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer*. 1998; 83:1664–1678.
3. Liversedge RL. Oral malignant melanoma. *Br J Oral Surg*. 1975;13: 40–55.
4. Shah JP, Huvos AG, Strong EW. Mucosal melanomas of the head and neck. *Am J Surg*. 1977;134:531–535.
5. Snow GB, van der Esch EP, van Slooten EA. Mucosal melanomas of the head and neck. *Head Neck Surg*. 1978;1:24–30.
6. Wr, Moran WJ. Melanoma of the upper aerodigestive tract: a review of 21 cases. *Head Neck Surg*. 1986;8:309–312.
7. Trapp TK, Fu YS, Calcaterra TC. Melanoma of the nasal and paranasal sinus mucosa. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1987;113: 1086–1089.

8. Matias C, Corde J, Soares J. Primary malignant melanoma of the nasal cavity. A clinicopathologic study of nine cases. *J Surg Oncol*. 1988;39:29–32.
9. Franquemont DW, Mills SE. Sinonasal malignant melanoma. A clinicopathologic and immunohistochemical study of 14 cases. *Am J Clin Pathol*. 1991;96:689–697.
10. Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW, et al. Volume of malignant melanoma is superior to thickness as a prognostic indicator: preliminary observation. *Dermatol Clin*. 1991;9:643–648.
11. Patel SG, Prasad ML, Escrig M, et al. Primary mucosal malignant melanoma of the head and neck. *Head Neck*. 2002;24:247–257.
12. RicardoHsieh R, Nico MMS, Coutinho-Camillo CM, et al. The CDKN2A and MAP Kinase pathways: molecular roads to primary oral mucosal melanoma. *Am J Dermatopathol*. In press.
13. Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, et al. Main roads to melanoma. *J Trans Med*. 2009;7:86.
14. Gaggioli C, Sahai E. Melanoma invasion—current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res*. 2007;20:161–172.
15. Shih IM, Speicher D, Hsu MY, et al. Melanoma cell-cell interactions are mediated through heterophilic Mel-CAM/ligand adhesion. *Cancer Res*. 1997;57:3835–3840.
16. Haass NK, Smalley KSM, Li L, et al. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res*. 2005;18:150–159.
17. van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*. 2001;305:285–298.
18. Rathinam R, Alahari SK. Important role of integrins in the cancer biology. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29:223–237.
19. Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Met Rev*. 2005;24:195–222.
20. Cavallaro U, Dejana E. Adhesion molecule signaling: not always a sticky business. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12:189–197.
21. Sawada N, Murata M, Kikuchi K, et al. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc*. 2003;36:147–156.
22. Cohn ML, Goncharuk VN, Diwan AH, et al. Loss of claudin-1 expression in tumor-associated vessels correlates with acquisition of metastatic phenotype in melanocytic neoplasms. *J Cutan Pathol*. 2005;32:533–536.
23. Langbein L, Pape UF, Grund C, et al. Tight junction-related structures in the absence of a lumen: occludin, claudins and tight junction plaque proteins in densely packed cell formations of stratified epithelia and squamous cell carcinomas. *Eur J Cell Biol*. 2003;82:385–400.
24. Billings SD, Walsh SV, Fisher C, et al. Aberrant expression of tight junction-related proteins ZO-1, claudin-1 and occludin in synovial sarcoma: an immunohistochemical study with ultrastructural correlation. *Mod Pathol*. 2004;17:141–149.
25. Kominsky SL, Argani P, Korz D, et al. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*. 2003;22:2021–2033.
26. Lourenço SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, et al. Claudin-7 down-regulation is an important feature in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2010;57:689–698.
27. Lourenço SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, et al. Oral squamous cell carcinoma: status of tight junction's claudins in the different histopathological patterns and relationship with clinical parameters. A tissue microarray based study of 136 cases. *J Clin Pathol*. 2010;63:609–614.
28. Michl P, Barth C, Buchholz M, et al. Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2003;63:6265–6271.
29. Sato N, Fukushima N, Maitra A, et al. Gene expression profiling identifies genes associated with invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Am J Pathol*. 2004;164:903–914.
30. Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, et al. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res*. 2003;9:2567–2575.
31. Thies A, Schachner M, Moll I, et al. Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer*. 2002;38:1708–1716.
32. Denton KJ, Stretch JR, Gatter KC, et al. A study of adhesion molecules as markers of progression in malignant melanoma. *J Pathol*. 1992;167:187–191.
33. Johnson JP, Bar EM, Jansen B, et al. Melanoma progression-associated glycoprotein MUC18/MCAM mediates homotypic cell adhesion through interaction with a heterophilic ligand. *Int J Cancer*. 1997;73:769–774.
34. Natali P, Nicotri MR, Cavaliere R, et al. Differential expression of intercellular adhesion molecule 1 in primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res*. 1990;50:1271–1278.
35. Schlagbauer WH, Jansen B, Muller M, et al. Influence of MUC18/MCAM/CD146 expression on human melanoma growth and metastasis in SCID mice. *Int J Cancer*. 1999;81:951–955.
36. Lourenço SV, A Martin Sanguenza, Sotto MN, et al. Primary oral mucosal melanoma: a series of 35 new cases from South America. *Am J Dermatopathol*. 2009;31:323–330.
37. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110:673–687.
38. Moretti S, Martini L, Berti E, et al. Adhesion molecule profile and malignancy of melanocytic lesions. *Melanoma Res*. 1993;3:235–239.
39. Yoshinaga IG, Vink J, Dekker SK, et al. Role of alpha 3 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins in melanoma cell migration. *Melanoma Res*. 1993;3:435–441.
40. Zhu N, Eves PC, Katerinaki E, et al. Melanoma cell attachment, invasion, and integrin expression is upregulated by tumor necrosis factor alpha and suppressed by alpha melanocyte stimulating hormone. *J Invest Dermatol*. 2002;119:1165–1171.
41. Heino J, Ignatz RA, Hemler ME, et al. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor- β . *J Biol Chem*. 1989;164:380–388.
42. Mortarini R, Anichini A. From adhesion to signalling: roles of integrins in the biology of human melanoma. *Melanoma Res*. 1993;3:87–97.
43. Danen EH, Van Muijen GN, Ruiter DJ. Role of integrins as signal transducing cell adhesion molecules in human cutaneous melanoma. *Cancer Surv*. 1995;24:43–65.
44. Johnson RC, Fenn NJ, Horgan K, et al. Follow-up of patients with a thin melanoma. *Br J Surg*. 1999;86:619–621.
45. Seftor RE, Seftor EA, Hendrix MJ. Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 1999;18:359–375.
46. McGary EC, Lev DC, Bar-Eli M. Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. *Cancer Biol Ther*. 2002;1:459–465.
47. Albelda SM, Mette SA, Elder DE, et al. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res*. 1990;50:6757–6764.
48. Schadendorf D, Gawlik C, Haney U, et al. Tumour progression and metastatic behaviour in vivo correlates with integrin expression on melanocytic tumours. *J Pathol*. 1993;170:429–434.
49. Natali PG, Hamby CV, Felding-Habermann B, et al. Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res*. 1997;57:1554–1560.
50. Bachmann IM, Ladstein RG, Straume O, et al. Tumor necrosis is associated with increased alphavbeta3 integrin expression and poor prognosis in nodular cutaneous melanomas. *BMC Cancer*. 2008;8:362.
51. Neto DS, Pantaleão L, de Sá BC, et al. Alpha-v-beta3 integrin expression in melanocytic nevi and cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol*. 2007;34:851–856.
52. Danen EH, Ten Berge PJ, Van Muijen GN, et al. Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. *Histopathology*. 1994;24:249–256.
53. Agarwal R, Mori Y, Cheng Y, et al. Silencing of claudin-11 is associated with increased invasiveness of gastric cancer cell. *Plos One*. 2009;4:e8002.
54. Matsuda M, Kubo A, Furuse M, et al. A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules during the intercellular movement of epithelial cells. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 7):1247–1257.
55. Leotlela PD, Wade MS, Duray PH, et al. Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene*. 2007;26:3846–3856.
56. French AD, Fiori JL, Camilli TC, et al. PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci*. 2009;6:93–101.
57. Lehmann JM, Riethmüller G, Johnson JP. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:9891–9895.
58. Johnson JP, Rummel MM, Rothbacher U, et al. MUC18: A cell adhesion molecule with a potential role in tumor growth and tumor

- cell dissemination. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;213(pt 1): 95–105.
59. Shih IM, Elder DE, Hsu MY, et al. Regulation of Mel-CAM/MUC18 expression on melanocytes of different stages of tumor progression by normal keratinocytes. *Am J Pathol*. 1994;145:837–845.
60. Xie K, Wang Y, Huang S, et al. Nitric oxide-mediated apoptosis of K-1735 melanoma cells is associated with downregulation of Bcl-2. *Oncogene*. 1997;15:771–779.
61. Swart GW, Lunter PC, Kilsdonk JW, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166): signaling at the divide of melanoma cell clustering and cell migration? *Cancer Met Rev*. 2005;24:223–236.
62. van Kempen LC, van den Oord JJ, van Muijen GN, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol*. 2000;156: 769–774.
63. Schadendorf D, Heide J, Gawlik C, et al. Association with clinical outcome of expression of VLA-4 in primary cutaneous malignant melanoma as well as P-selectin and E-selectin on intratumoral vessels. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:366–371.
64. Miele ME, Bennett CF, Miller BE, et al. Enhanced metastatic ability of TNF-alpha-treated malignant melanoma cells is reduced by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) antisense oligonucleotides. *Exp Cell Res*. 1994;214:231–241.
65. Thies A, Moll I, Berger J, et al. CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J Clin Oncol*. 2002;20:2530–2536.

APÊNDICE 3

Artigo publicado na revista The American Journal of Dermatopathology em
Junho de 2009.

Primary Oral Mucosal Melanoma: A Series of 35 New Cases From South America

Silvia Vanessa Lourenço, DDS, PhD,*†‡ Martin Sangüeza A., MD,§
 Mirian Nacagami Sotto, MD, PhD,† Sheyla Batista Bologna, DDS,* Thaís Bello di Giacomo, MD,†
 Marcilei E. Buim, PhD,¶ Claudia Malheiros Coutinho-Camillo, PhD,¶
 Sabrina Daniela Silva, DDS, PhD,¶ Gilles Landman, MD, PhD,¶
 Fernando Augusto Soares, MD, PhD,*¶ and Marcello Menta Simonsen Nico, MD†

Abstract: Oral mucosal melanoma is rare and reported to be more aggressive than its cutaneous counterpart. Due to the rarity of this entity, data on epidemiology, tumor behavior, treatment, follow-up, and survival of patients are mainly based on single case reports. The few existing series of patients show that oral mucosa melanoma has its peak between 41 and 60 years of age, and male to female ratio is 2:1. Preferred oral sites include hard palate and maxillary alveolar crests. Risk factors have not been clearly identified, and surgical treatment is still the treatment of choice for oral mucosal melanomas. The authors retrospectively studied 35 patients with primary melanoma of the oral cavity to report their clinical and pathological features, such as age, sex, site of the tumor, metastasis, treatment, response to therapy, and outcome. We found no significant sex predominance, and the mean age of the patients was 60.6 years, with a range from 9 to 91 years. The majority of the patients (71.42%) had palate commitment, and invasive histopathological aspect was observed in 80% of the specimens (grade 3). Long-distance metastasis was found in 60% of the cases. Fourteen patients were submitted to wide surgical resections, with local relapse being observed in 11 of them (78.5%). The authors suggest that improved outcome in oral malignant melanoma requires the development of new therapies and the prevention of distant metastasis.

Key Words: oral mucosa, melanoma

(*Am J Dermatopathol* 2009;31:323–330)

INTRODUCTION

Primary melanomas of the oral mucosa are rare, accounting for only 0.5% of all oral malignancies and with an incidence of 1.2 cases per 10 million per year.^{1,2}

From the *Department of General Pathology, Dental School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; †Department of Dermatology, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ‡Tropical Medicine Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; §Department of Pathology, Hospital Obrero, La Paz, Bolivia; and ¶Department of Pathology, A.C. Camargo Hospital, São Paulo, Brazil.

Supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo grant 06/56625-5.

Reprints: Dr. Silvia Vanessa Lourenço, DDS, PhD, General Pathology Department, Dental School, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 CEP 05508-000 São Paulo, SP, Brazil (e-mail: silvialour-enco@usp.br).

Copyright © 2009 by Lippincott Williams & Wilkins

Ravid and Esteves³ in 1960 identified a total of 117 cases reported worldwide, and in 1982, Batsakis et al reported a review of 531 cases.⁴ Since then, several series have added approximately another 420 cases, resulting in nearly 1000 reported cases.^{5,6} Most of these data refer to single case reports, and due to the rarity of the disease, large institutional information on oral mucosal melanoma with detailed clinicopathologic correlations is scarce. A recently published series of head and neck malignant melanoma presented 40 cases of the Memorial Kettering Cancer Center and described tumors from various mucosal sites, including oral.⁷ Previously, in 1997, the WESTOP Banff workshop proceedings published the aspects of 50 cases of oral mucosal melanoma from 14 different institutions.⁵

Series of oral melanoma cases in the South American continent have not been reported, and information on the clinicopathological profile of tumors is missing. The authors report 35 new cases of primary oral mucosal melanoma from 3 different institutions in South America with a review of their histopathological features and follow-up.

PATIENTS AND METHODS

The records of 35 patients diagnosed as having oral mucosal melanoma in 3 major hospitals in Brazil and Bolivia (Hospital das Clínicas, Medical School, University of São Paulo and Hospital A.C. Camargo, São Paulo, Brazil, and Hospital Obrero, La Paz, Bolivia), for the past 30 years, were reviewed. Clinical features, such as sex, age, site of the tumor, and presence of metastasis; treatment; and outcome were assessed.

The histopathology of all cases was reexamined. Diagnosis of primary oral mucosal melanoma was based on the clinical information available, which excluded history of melanoma at another site or evidence of metastatic melanoma from an extramucosal site. Confirmation of the diagnosis was established with the histopathological examination of the archival material. The pathology review of the melanoma slides searched for the presence of in situ melanoma or a dominant tumor mass. Failure to detect an in situ melanoma component was not mandatory to exclude the case from the study because the diagnosis was established on clinicopathological basis. Pathological parameters evaluated included anatomic site, level of invasion and thickness of the tumor

FIGURE 1. Clinical examples of melanoma cases included in the study. A, Large irregularly pigmented plaque with ill-limits on the palate of a male patient. B, Multiple black patches with irregular limits in the hard palate of a female patient. C, Large pigmented lesion with irregular contours on the anterior mandibular alveolar mucosa up to labial and vestibular mucosa of a female patient.

(when possible), cytology, ulceration, necrosis, vascular invasion, and perineural involvement by tumor. Vascular invasion was considered when tumor emboli could be detected in vascular lumen, and perineural invasion was evaluated when tumor cells were observed in close contact or within nerve fibers. In some cases, the melanocytic origin of the tumor was supported by immunohistochemistry using a panel of melanocytic differentiation markers.

Tumor thickness was measured with an ocular micrometer. When the mucosal surface was intact, thickness was recorded as the distance from the top of the uppermost epithelial layer of the squamous mucosa to the deepest invasive melanoma component. For ulcerated tumors, the distance from the top of the ulcer to the deepest invasive tumor cell was recorded (fibrin crust and exudate was not measured). Levels of invasion were considered as noninvasive (in situ), micro-invasive (level 1) (small cell clusters in the superficial lamina propria), invasion into the lamina propria (level 2), and deep invasion into skeletal muscle and bone (level 3).

Cytologically, the tumors were classified according to Prasad et al⁶ as polymorphous or monomorphous types. Polymorphism was defined as cytological heterogeneity, characterized by a mixed population of melanoma cells varying in shape and size (mainly a mix of small cells, epithelioid and spindle cells). Multinucleated tumor cells also composed this type of tumor. Monomorphous tumors were either predominantly epithelioid or spindle cells.

The data collected from patients' records and analysis of histopathological slides were organized in tables. The main histopathological aspects of the tumors were recorded by digital photomicrograph. Statistical analysis of the data presented was also performed. For frequency analysis in contingency tables, statistical analyses of associations between variables were performed by the Fisher exact test (with significance set for $P < 0.05$).

RESULTS

Clinical features of all cases, including age, sex, and race of patients, anatomic site of the primary oral mucosal melanoma, occurrence of metastasis, treatment modality, and recurrence are described in Table 1. Clinical examples of oral mucosal melanomas are depicted in Figure 1. Table 2 summarizes clinical and histopathological data on this series of cases.

Age, Sex, and Race

Patients' ages ranged from 9 to 91 years, and the average age at the time of diagnosis was 61 years. Median age of the patients was 59.4 years. There were 18 men (51.43%) and 17 women (48.57%), and the main prevalence of melanomas were among whites (21 patients, 75%) against non-whites (25%) (5 black/Afro-Brazilians, 2 Asians). In 7 cases, we could not identify the patients' race in the records.

Site of the Lesions

Most of cases (25; 71.42%) were localized in palate/upper alveolar ridge. Mandible, retromolar trigone, and floor of the mouth were involved in 3 cases (8.57%); 3 melanomas

TABLE 1. Clinical Information on the 35 Cases of Oral Mucosal Melanoma

Case	Sex	Age (yr)	Race	Primary Tumor	Recurrence	Treatment Modality	Metastasis	Survival (mo)
1	F	59	White	Hard palate, alveolar ridge	Hard palate, alveolar ridge	Cryotherapy + chemotherapy	Cervical nodes and lungs	11
2	M	56	Black	Lower alveolar ridge	None	Surgery	Lungs and parotid	12
3	F	37	White	Lateral border of tongue	None	Chemotherapy	Lungs	?
4	M	51	White	Superior vestibular sulcus	None	Chemotherapy	Lungs	15
5	M	57	White	Palate and alveolar ridge	Skin	Surgery + chemotherapy	Lungs and submandibular nodes	25
6	F	63	Asian	Hard palate	None	Surgery + radiotherapy	Submandibular and cervical nodes	14
7	F	36	White	Hard palate, alveolar ridge	Palate	Surgery + chemotherapy	Cervical nodes	22
8	M	60	Afro-Brazilian	Hard and soft palate, floor of the mouth	Various sites of oral cavity	Chemotherapy + radiotherapy	NA	40
9	F	61	White	Hard palate, alveolar ridge	Hard palate	Surgery	Lungs and cervical nodes	?
10	F	59	White	Hard palate and upper alveolar ridge	None	Chemotherapy + radiotherapy	Submandibular and cervical nodes	3
11	M	66	White	Hard palate, alveolar ridge	None	Surgery + cryotherapy	Brain and cervical nodes	9
12	F	69	White	Upper lip and alveolar ridge	Alveolar ridge	NA	NA	30
13	M	69	White	Hard palate, alveolar ridge	None	Surgery	Cervical nodes and lungs	?
14	F	73	White	Hard palate, alveolar ridge	None	Surgery	Submentonian nodes and lungs	8
15	F	87	White	Hard palate, alveolar ridge	None	Surgery	Submandibular nodes and lungs	49
16	F	56	White	Mandible	NA	NA	Infratemporal fossa, cervical nodes	?
17	M	51	White	Hard palate	None	Surgery + chemotherapy	Cervical nodes	27
18	M	61	NA	Floor of mouth, lower alveolar ridge, lateral border of tongue, hard and soft palate	None	Surgery	Cervical nodes	?
19	M	57	NA	Hard palate, alveolar ridge	None	Surgery + radiotherapy	None	72
20	M	78	NA	Hard palate, alveolar ridge and buccal mucosa	Various sites of oral cavity	Surgery	Cervical nodes and lungs	?
21	M	91	NA	Hard palate	NA	NA	NA	?
22	F	46	Afro-Brazilian	Labial mucosa and lower alveolar ridge	None	Surgery	NA	12
23	F	65	White	Hard palate and buccal mucosa	Hard palate	Surgery	Cervical nodes	17
24	M	67	Asian	Hard palate	NA	NA	NA	?
25	M	9	Black	Hard palate	Hard palate	NA	Cervical nodes	72
26	M	87	White	Retromolar trigone and lower alveolar ridge	NA	NA	Cervical nodes	13
27	M	47	White	Hard palate	NA	NA	NA	?
28	F	51	White	Hard palate	NA	NA	NA	?
29	F	46	White	Upper alveolar ridge	NA	NA	NA	?
30	F	49	NA	NA	NA	NA	NA	?
31	M	63	NA	Labial mucosa	NA	NA	NA	?
32	F	71	NA	Hard palate	NA	NA	NA	?
33	F	83	White	Hard palate and alveolar ridge	Hard palate	Cryotherapy	None	48
34	M	88	White	Hard palate	None	Cryotherapy	Cervical nodes	?
35	M	75	Black	Hard palate	None	None	None	?

F, female; M, male; NA, not available.

(8.57%) were detected in the labial mucosa and 2 (5.71%) on buccal/vestibular mucosa. Only 1 case (2.86%) was diagnosed on the lateral border of tongue, and in 1 case (2.86%), we could not identify the site of the lesion.

Histopathology

Histopathological features of each case are described in Table 3 and illustrated in Figures 2 and 3.

Most cases of oral mucosa melanoma were diagnosed as level 3 of invasion (28 cases, 82.35%). Level 2 of tumor invasion was observed in 5 tumors (14.71%), level 1 was only seen in 1 case (2.94%), and in 1 case, the depth of invasion could not be evaluated.

Thirty-four tumors were melanotic, and only 1 oral mucosal melanoma was amelanotic.

The tumors analyzed presented varying degree of architectural and cell pleomorphism. The cellular composition of the oral mucosal melanomas analyzed varied, being 18 (51.42%) monomorphous and 17 (48.58%) polymorphous. Necrosis was found in 16 cases (45.71%) and varies from focal to extensive. Vascular embolization was observed in 20 (60.61%) of 33 cases, and perineural invasion was detected in 9 (25.71%) of 35 cases.

Statistical analysis showed that vascular invasion was detected in 70% (14 cases) of the tumors with polymorphous cell composition, whereas in 76.92% (10 cases) of tumors with monomorphous cell composition, vascular invasion was not present ($P = 0.008$). Additionally, necrosis was statistically associated with tumors with polymorphous cell morphology (11 cases, 78.57%) and only 30% of tumors with monomorphous cell composition presented necrotic areas ($P = 0.005$).

Recurrence and Metastasis

Information on recurrences was available for 25 patients. Among those, 10 patients had positive records of some type of tumor recurrence (40%). Relationship between tumor recurrences with the histopathological variables is described in Table 4. Information on metastasis was recorded for 24 patients. Long-distance metastases were found in 12 patients (34.28%), and the most common site was the lung (9 individuals). Other sites of long-distance metastasis were liver (3), brain (2), and bones (2). Lymph node regional disease was present in at least 19 (54.28%) of the 35 patients.

Survival

Survival rate information was available in the records of 19 patients. The lowest survival rate was 3 months and the highest was 72 months with median survival time of 26.26 months.

DISCUSSION

Mucosal melanomas are rare and highly malignant tumors. Compilations of cases of oral melanomas are scarce, and our series of cases gathered important information on occurrences from 3 different centers in South America, adding 35 new cases to the literature.

The clinical features shown in our series are mostly in accordance with other reports in the literature. The mean age

TABLE 2. Summary of Clinical Information and Histopathological Analysis of 35 Cases of Oral Mucosal Melanoma

		Variables	Values	
			n	(%)
Clinical information	Age (yr)	0–20	1	2.85
		21–40	2	5.71
		41–60	14	40
		61–80	13	37.14
		>80	5	14.28
	Sex	Male	18	51.43
		Female	17	48.57
	Race	White	21	75
		Nonwhite	7	25
	Site of lesions	Palate/upper alveolar ridge	25	71.42
		Retromolar trigone/floor of mouth	3	8.57
		Labial mucosa	3	8.57
		Buccal mucosa/vestibular mucosa	2	5.71
		Lateral border of tongue	1	2.86
		Not informed	1	2.86
	Histopathological analysis	Level		
		1	1	2.94
		2	5	14.71
		3	28	82.35
	Cell composition	Not informed	1	2.94
		Monomorphous	18	51.42
		Polymorphous	17	48.58
	Melanin	Absent	1	2.86
		Yes	34	97.14
	Necrosis	No	19	54.29
		Yes	16	45.71
	Vascular invasion	No	13	37.14
		Yes	20	60.61
	Perineural invasion	Not informed	2	2.24
		No	26	74.29
		Yes	9	25.71

of incidence in the cases reported herein was 61 years, and other authors refer an incidence peak between the fifth and sixth decades of life.^{5,8,9} There was also a patient younger than 30 years, which is exceedingly uncommon. We found no significant sex predilection for oral mucosal melanomas as there were 18 men and 17 women in our series. This is in agreement with other reports that refer no sex predilection or a slight predilection for men or women.^{10–15}

Ethnic background of the patients reported herein included 21 whites, 5 Afro-Brazilians, and 2 Asians. There are reported racial differences in the incidence of oral mucosal melanomas, with a higher incidence in India, Africa, and Japan than in Western Countries.^{8,9} Some authors also associate the development of oral mucosal melanomas with long-standing benign preexisting pigmented lesions, which are most common in some ethnic groups, but our material did not allow such analysis.^{8,16}

TABLE 3. Histopathological Characteristics of the 35 Cases of Oral Mucosal Melanoma

Case	Level	Cellular Composition	Melanin	Necrosis	Vascular Invasion	Perineural Invasion
1	3	Monomorphous	Present	Present	Present	None detected
2	3	Polymorphous	Present	Present (extensive)	Present	None detected
3	NA	Monomorphous	Present	Present (extensive)	NA	NA
4	2	Polymorphous	Present	Absent	None detected	None detected
5	3	Polymorphous	Scarce	Present	Present	Present
6	3	Monomorphous	Present	Present (extensive)	None detected	None detected
7	3	Polymorphous	Present	Present (extensive)	Present	Present
8	3	Monomorphous	Present	Absent	None detected	None detected
9	3	Polymorphous	Present	Absent	Present	Present
10	3	Monomorphous	Present	Absent	Present	None detected
11	3	Monomorphous	Present	Absent	Present	None detected
12	3	Polymorphous	Present	Present	None detected	None detected
13	3	Polymorphous	Present	Present	Present	None detected
14	3	Polymorphous	Present	Present	Present	Present
15	2	Monomorphous	Present	Absent	None detected	None detected
16	3	Monomorphous	Present	Absent	Present	None detected
17	3	Polymorphous	Present	Present (extensive)	Present	Present
18	3	Polymorphous	Present	Present	Present	None detected
19	3	Monomorphous	Absent	Absent	Present	Present
20	3	Polymorphous	Present	Absent	Present	None detected
21	3	Polymorphous	Present	Present	Present	None detected
22	2	Monomorphous	Present	Absent	None detected	None detected
23	3	Polymorphous	Present	Present	Present	Present
24	3	Monomorphous	Present	Absent	None detected	None detected
25	3	Polymorphous	Present	Absent	Present	None detected
26	3	Polymorphous	Present	Absent	None detected	None detected
27	3	Monomorphous	Present	Present (extensive)	NA	NA
28	2	Monomorphous	Present	Absent	None detected	None detected
29	3	Monomorphous	Present	Absent	None detected	None detected
30	3	Monomorphous	Present	Absent	None detected	None detected
31	3	Polymorphous	Present	Present (extensive)	Present	None detected
32	2	Monomorphous	Present	Absent	None detected	None detected
33	3	Polymorphous	Present	Absent	Present	Present
34	3	Monomorphous	Present	Absent	Present	Present
35	1	Monomorphous	Present	Absent	None detected	None detected

About 80% of oral cavity melanomas are located on the hard palate or mandibular gingivae. Other frequent sites are buccal mucosa, tongue, and floor of the mouth.^{8,10,17,18} The hard palate was the preferred site of primary oral malignant

melanomas in our series [25 (71.42%) of 35 patients]. Other locations of tumors were alveolar ridge, buccal mucosa, vestibular sulcus, and tongue. Differentiation between primary and secondary melanoma lesions must be done by clinical and

FIGURE 2. Examples of histopathological levels in 2 different cases of oral mucosal melanomas. A, Level 1 lesion, with neoplastic melanocytes restricted to the epithelial compartment (hematoxylin and eosin, original magnification $\times 40$). B, Level 3 lesion with neoplastic cells compromising the full thickness of the lamina propria up to the submucosa and deep connective tissue structures (hematoxylin and eosin, original magnification $\times 40$).

FIGURE 3. Histopathological aspects of oral mucosal melanoma. A, B, Level 1 tumors with neoplastic melanocytes restricted to the covering epithelium. In A, note the nest of neoplastic melanocytes (hematoxylin and eosin, original magnification $\times 100$ and $\times 250$, respectively). C, Oral mucosal melanoma with neoplastic melanocytes occupying the lamina propria, with marked presence of melanin (hematoxylin and eosin, original magnification $\times 200$). D, E, Examples of oral mucosal melanomas mainly composed of epithelioid cells (monomorphous). In E, tumor cells are arranged in fascicles and note the cell pleomorphism and mitotic figures (hematoxylin and eosin, original magnification $\times 250$ and $\times 200$, respectively). F, Example of an oral mucosal melanoma with predominance of spindle neoplastic melanocytes (hematoxylin and eosin, original magnification $\times 250$). G, Infiltration of salivary gland lobules by neoplastic melanocytes (hematoxylin and eosin, original magnification $\times 200$). H, Oral mucosal melanoma with vascular embolization (hematoxylin and eosin, original magnification $\times 250$). I, Oral mucosal melanoma: perineural infiltration (hematoxylin and eosin, original magnification $\times 250$).

histopathological demonstration, evidence of tumor activity in the lesion, and exclusion of melanoma in any other location, which was performed in all of our patients.⁷

Histopathological classification and microstaging of cutaneous melanomas using Breslow and Clark levels^{19,20} cannot be applied to oral mucosal tumors due to structural differences between skin and mucosa, thus a definitive classification of oral melanomas has not yet been drawn up.^{10,21} Prasad et al in 2004²⁰ proposed a classification based

on the level of melanoma invasion, and this classification was employed in this study. Most patients in the present series were diagnosed with disease at level 3 of invasion and only 1 was diagnosed with disease at level 1. This may be due to delays in the process of the diagnosis of pigmented oral lesions, and therefore, professionals involved in the area should be aware of this possibility during clinical examinations. As suggested by Prasad et al, one of the most important histopathological predictor of poorer survival is tumor

TABLE 4. Relationship Between Recurrences and Histopathological Variables

Variables	Recurrence		P
	No, n (%)	Yes, n (%)	
Level			
1	1 (33.33)	0	0.142
2	0	2 (10)	—
3	2 (66.67)	18 (90)	—
Cell type			
Monomorphous	2 (66.67)	8 (38.1)	0.550
Polymorphous	1 (33.33)	13 (61.9)	—
Melanin			
No	1 (33.33)	1 (4.76)	0.239
Yes	2 (66.67)	20 (95.24)	—
Necrosis			
No	3 (100)	10 (50)	0.229
Yes	0	10 (50)	—
Vascular invasion			
No	1 (33.33)	4 (20)	0.539
Yes	2 (66.67)	16 (80)	—
Perineural invasion			
No	2 (66.67)	19 (95)	0.249
Yes	1 (33.33)	1 (5)	—

histological level, being thick tumors (level 3) a trend for worst outcome.

Different cell types have been described in oral mucosal melanomas and this was also observed in our series.²⁰ Additionally, a high level of cell pleomorphism was a common feature in all tumors studied. Cell morphology in the cases presented herein ranged from epithelioid, spindle, or mixed. Those tumors with the latter pattern were classified as polymorphous (18 cases), whereas tumors with exclusive epithelioid cell pattern or spindle cells only were classified as monomorphous (17 cases). This classification seems to have no impact in prediction of tumor behavior; however, we observed in our series that polymorphous tumors had a slightly higher incidence of vascular infiltration and necrosis. Prasad et al⁷ in a study of malignant melanoma of squamous mucosa of various sites speculated that tumor heterogeneity might spread or escape patient's immune response due to advantages conferred by tumors subclones. This tendency needs to be confirmed in a higher number of cases to be considered an additional criterion of poor prognosis on multivariable analysis.

A great number of cases in our series showed vascular and/or perineural infiltration. Prasad et al in 2002 revealed that presence of vascular invasion was an important adverse prognostic finding for melanomas, as once the tumor gained access to lymphatic and blood circulation, its spread to distant sites is greatly facilitated. Following this line of analysis, long-distance metastasis remains as the most impacting prognosis factor for these tumors.^{22–25} Long-distance metastases were found in 12 patients, and the most common site was the lung. Lymph node regional disease was present in at least 19 (54.28%) of the 35 patients.

Most oral melanomas present at an advanced stage at the time of diagnosis. Malignant melanomas of oral cavity are lesions of difficult treatment, and the treatment of most patients is left to the discretion of the individual surgeon, based on surgical possibilities and life quality.^{26–28} In our series, treatment modalities ranged from surgical (18 cases) to cryotherapy, chemotherapy, and radiotherapy. Guidelines for the use of chemotherapy, evidence on the effectiveness of radiotherapy, and immunotherapy are still needed.^{6,7,9}

In general, prognosis for patients with oral malignant melanomas is poor, with lower survival rates than for patients with other melanomas. It is unknown if the worse prognosis of oral mucosal melanoma is due to differences in its histopathological behavior, increased vascularity, diagnosis delay, or complex anatomical features, which jeopardize complete tumor excision.⁹ Local relapse was observed in 9 of the patients who underwent surgery (50%). Other therapies, in most cases used as palliation, may not be objectively analyzed for efficacy.

Follow-up information was scarce and unavailable for 13 patients, but among the other ones, 6 died in the first year after diagnosis, and by the end of 3 years, there were only 7 of them alive. Five were still alive after a 5-year period of follow-up. The 5-year cumulative survival rate in our patients was 15%, in agreement with other series.^{7,20} This is an indicator of the urgent need to improve treatment options and prevention of distant metastases.

Survival rates may be increased by early diagnosis and treatment. Clinicians should carefully examine oral cavity and biopsy suspicious clinical pigmented lesions to allow specific diagnosis of these entities.

REFERENCES

- Garzino-Demo P, Fasolis M, Maggiore GM, et al. Oral mucosal melanoma: a series of case reports. *J Craniomaxillofac Surg*. 2004;32:251–257.
- Hicks MJ, Flaitz CM. Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. *Oral Oncol*. 2000;36:152–169.
- Ravid JM, Esteves JA. Malignant melanoma of the nose and paranasal sinuses and juvenile melanoma of the nose. *Arch Otolaryngol*. 1960;72:431–444.
- Batsakis JG, Regezi JA, Solomon AR, et al. The pathology of head and neck tumors: mucosal melanomas. *Head Neck Surg*. 1982;4:404–418.
- Barker BF, Carpenter WM, Daniels TE, et al. Oral mucosal melanomas. The WESTOP Banff workshop proceedings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1997;83:672–679.
- Prasad ML, Busam KJ, Patel SG, et al. Clinicopathologic differences in malignant melanoma arising in oral squamous and sinonasal respiratory mucosa of the upper aerodigestive tract. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127:997–1002.
- Prasad M, Patel S, Hoshaw-Woodard S, et al. Prognostic factors for malignant melanoma of the squamous mucosa of the head and neck. *Am J Surg Pathol*. 2002;26:883–892.
- Lopez-Graniel CM, Ochoa-Carrillo FJ, Meneses-Garcia A. Malignant melanoma of the oral cavity: diagnosis and treatment experience in a Mexican population. *Oral Oncol*. 1999;35:425–430.
- Ulusal BG, Karatas O, Yildiz AC, et al. Primary malignant melanoma of the maxillary gingiva. *Dermatol Surg*. 2003;29:304–307.
- Chidzonga MM, Mahomya L, Marimo C, et al. Primary malignant melanoma of the oral mucosa. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65:1117–1120.
- Manolidis S, Donald PJ. Malignant mucosal melanoma of the head and neck: review of the literature and report of 14 patients. *Cancer*. 1997;80:1373–1386.

12. Panje WR, Moran WJ. Melanoma of the upper aerodigestive tract: a review of 21 cases. *Head Neck Surg.* 1986;8:309–312.
13. Lee SP, Shimizu KT, Tran LM, et al. Mucosal melanoma of the head and neck: the impact of local control on survival. *Laryngoscope.* 1994;104:121–126.
14. Takagi M, Ishikawa G, Mori W. Primary malignant melanoma of the oral cavity in Japan. With special reference to mucosal melanosis. *Cancer.* 1974;34:358–370.
15. Rapini RP, Golita LE, Greer RO, et al. Primary melanoma of the oral cavity: a review of 177 cases. *Cancer.* 1985;55:1543–1551.
16. Chaudhry AP, Hampel A, Gorlin RJ. Primary malignant melanoma of the oral cavity: a review of 105 cases. *Cancer.* 1958;11:923–928.
17. Rapidis AD, Apostolidis C, Vilos G, et al. Primary malignant melanoma of the oral mucosa. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61:1132–1139.
18. Gonzáles-García R, Naval Gías L, Martos PL, et al. Melanoma of the oral mucosa. Clinical cases and review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005;10:264–271.
19. Clark WH Jr, Alder DE, Guerry DG, et al. A model predicting survival in stage I melanoma based upon tumor progression. *J Natl Cancer Inst.* 1989;81:1893–1904.
20. Prasad ML, Patel SG, Huvos AG, et al. Primary mucosal melanoma of the head and neck. A proposal for microstaging localized, stage I (lymph node-negative) tumors. *Cancer.* 2004;100:1657–1664.
21. Pandey M, Mathew A, Iype EM, et al. Primary malignant mucosal melanoma of the head and neck region: pooled analysis of 60 published cases from India and review of literature. *Eur J Cancer Prev.* 2002;11:3–10.
22. Umeda M, Shimada K. Primary malignant melanoma of the oral cavity: its histological classification and treatment. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1994;32:39–47.
23. Ohashi K, Kasuga T, Tanaka N, et al. Malignant melanomas of the oral cavity: heterogeneity of pathological and clinical features. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992;420:43–50.
24. Peckitt NS, Wood GA. Malignant melanoma of the oral cavity. A case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990;70:161–164.
25. Tanaka N, Nagai I, Hiratsuka H, et al. Oral malignant melanoma: long-term follow up in three patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998;27:111–114.
26. Baltchford SJ, Koopmann CF Jr, Coulthard SW. Mucosal melanoma of the head and neck. *Laryngoscope.* 1986;96:929–934.
27. Storm FK III, Eilber FR, Morton DL, et al. Malignant melanoma of the head and neck. *Head Neck Surg.* 1978;1:123–128.
28. Tanaka N, Mimura M, Ogi K, et al. Primary malignant melanoma of the oral cavity: assessment of outcome from the clinical records of 35 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33:761–765.

APÊNDICE 4

Artigo publicado na revista The American Journal of Dermatopathology em Abril de 2013.

The American Journal of Dermatopathology

THE JOURNAL OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF DERMATOPATHOLOGY
Editor-in-Chief Omar P. Sangüeza, M.D.

CME NOW
AVAILABLE!

Wolters Kluwer | Lippincott Williams & Wilkins

www.amjdermatopathology.com

Volume 35 • Number 2 • April 2013

Full Text
OVID

Establishment and Characterization of an Oral Mucosal Melanoma Cell Line (MEMO) Derived from a Longstanding Primary Oral Melanoma

Silvia V. Lourenço, DDS, PhD,*† Sheyla B. Bologna, DDS,† Ricardo Hsieh, DDS, PhD,†
Martin Sanguenza, MD,‡ Juliana D. Fernandes, MD,§ and Marcello M.S. Nico, MD†

Abstract: Oral mucosal melanoma is rare. Its incidence peaks between 41 and 60 years of age; male/female ratio is 2:1. Preferred oral sites include hard palate and maxillary gingiva. Risk factors have not been clearly identified, but pigmented lesions may be present before the diagnosis of oral melanoma. We report an unusual case of oral mucosal melanoma of long-standing duration on hard palate and maxillary alveolar ridge in a male patient. Histopathologic features confirmed the diagnosis of invasive melanoma with a prominent in situ component. A cell lineage derived from the tumor was established and characterized, with phenotypic markers of melanocytes.

Key Words: cell culture, oral mucosa, melanoma

(*Am J Dermatopathol* 2012;0:1–4)

INTRODUCTION

Primary malignant melanoma has been described in virtually all sites and organ systems to which neural crest cells migrate. More than 90% of melanomas occur on the skin; approximately 1% of melanomas arise from all mucosal surfaces. Oral mucosal melanoma is extremely rare, accounting for only 0.5% of oral malignancies.^{1–4}

Large series of patients show that oral mucosa melanoma has its incidence peak between 41 and 60 years of age, and male/female ratio is 2:1.^{5–8} Preferred sites in the oral mucosa include hard palate and maxillary alveolar ridge. Risk factors have not been clearly identified, but according to some authors, pigmented lesions may be present in one-third of the patients, before the diagnosis of melanoma.^{7,9,10}

The oral mucosal melanomas are reported to be more aggressive than cutaneous counterpart. However, it is unknown if the worse prognosis of oral mucosal melanoma is because of differences in its histological features or, if late

diagnosis or anatomical features are determinant of such differences.¹¹

To present, only limited research has been performed to understand the behavior and physiopathology of oral mucosal melanomas. This is mainly because of its rarity and the difficulties in establishing in vitro and animal systems to perform functional and genetic investigation on this interesting type of melanomas.

We report herein a new case of oral mucosal melanoma of the hard palate and maxillary gingiva with the main characteristics of an in situ lesion and areas of superficial invasion. Additionally, a cell culture derived from this tumor was established and is presented, which may open up the possibility for new roads to melanoma investigation.

PATIENT AND METHODS

A 75-year-old Afro-Brazilian male reported a black spot on the hard palate of 7-year duration. He had noticed a slow progressive growth of the lesion during the previous 3 years. Patient denied smoking and/or alcoholism. Clinical examination revealed a large and irregularly pigmented patch affecting the right hard palate and tuber, alveolar ridge, and vestibular gingival mucosa (Figs. 1A, B). Computed tomography revealed no other internal tumor mass. Medical history was uneventful. Incisional biopsy was performed in 4 different sites for histopathological analysis. An additional biopsy specimen was used for establishment of cell culture, considering the patient's authorization and according to the Local Ethical Committee Guidelines.

Cell Culture

A fragment of the biopsy material was finely minced with a scalpel under sterile conditions and the explants were incubated in 25-mm² culture flasks with RPMI 1640 medium (Cultilab, Sao Paulo, Brazil), supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 10% fetal calf serum. The incubation occurred at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

After 5–7 days, a cell monolayer could be observed growing out of the explants. When the cell monolayer reached 75%, cells were subcultured 2–5 times before cell line characterization was performed by immunocytochemistry and transmission electron microscopy. The panel of antibodies used for cell line characterization is described in Table 1.

From the *General Pathology Department, Dental School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; †Dermatology Department, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ‡Pathology Department, Hospital Obrero, La Paz, Bolivia; and §Medical School, Federal University of Bahia, Bahia, Brazil.

Supported by a Governmental Granting Agency—Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant 2010/50423-7.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Reprints: Silvia V. Lourenço, DDS, PhD, Dental School, University of São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária, São Paulo, CEP 05508-000, Brazil (e-mail: silvialourenco@usp.br).

Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

FIGURE 1. A, B, Clinical aspect of oral mucosal melanoma: irregularly pigmented patch on right palate (A) and alveolar ridge (B). C, Proliferation of melanocytes in irregular pattern occupying mostly the lower layers of mucosal epithelium. The presence of melanophages in the lamina propria (haematoxylin and eosin, original magnification, $\times 100$). D, Detail of pleomorphic melanocytes arranged in nests in the basal layer of the epithelial crest (haematoxylin and eosin, original magnification, $\times 400$). E, F, Human oral mucosal melanoma cell culture (MEMO): stellate and spindle cells with dark granules on the tips of the cytoplasmic prolongations (F), and polyhedral cells showing dark granules on their cytoplasm (G) (phase contrast microscopy, original magnification, $\times 400$). G, H, MEMO cells positive for S-100 (H) and for HMB-45 (I) (streptavidin peroxidase, original magnification, $\times 400$). I, Transmission electron microscopy of cell cultures from a primary oral mucosal melanoma: the presence of irregular melanosomes in the cytoplasm.

TABLE 1. Antibodies, Clones, Source, and Title

Primary Serum	Clone	Source	Title
S-100	Polyclonal	Dako Cytomation	1:50
HMB-45	HMB-45	Dako Cytomation	1:50
Melan A	A103	Dako Cytomation	1:50

Cell Culture Characterization

Immunocytochemistry

Cells in passage 3 were plated on a 6-well ELISA plate containing glass coverslips, at a density of 10^3 cells per well and incubated in a 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere for 48 hours. After this period, cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde, treated with 1% Triton X-100 in phosphate buffered saline (PBS) and incubated with the monoclonal antibodies at room temperature. Incubation period and antibodies titles are described in Table 1. This was followed by incubation with the indirect dextran polymer detection system (EnVision—Dako Carpinteria, CA). Staining was completed by 3-minute incubation with 3/3 diaminobenzidine tetrachloride. Cells were then incubated with Mayer's hematoxylin for nuclear staining. All procedures were preceded by a PBS rinse. The glass coverslips containing the cell monolayer were then mounted with Vecta Shield mountant (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and observed under an optical microscope equipped with digital camera for photographic register. Coverslips containing the cell monolayer incubated with non-immune serum served as negative controls.

Electron Microscopy

Cells in passage 3 were plated on a 25-cm² flask at a density of 3×10^6 and incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere for 48 hours. After this period, the cultured cells were scraped from the flask and centrifuged at 1000 RPM for 10 minutes. The pellet of cells was then fixed in 2% glutaraldehyde, washed in PBS, and postfixed in 1% osmium tetroxide. After stepwise dehydration with ethanol (70%–100%), the cells were embedded in Spurr resin, and ultrathin sectioning was performed (800–1000 Å) using an ultratome (LKB U-5 Ultratome, LKB, Sweden). The cells were stained with 4% uranyl acetate and then with Reynolds lead citrate. The grids were studied and micrographed with a Philips TEM 400 transmission electron microscope, operating at 80 kV.

RESULTS

Histopathologic analysis of the biopsied specimens revealed, for the most part, melanoma in situ, with junctional activity and intraepithelial nests of neoplastic atypical melanocytes. Neoplastic melanocytes were also seen in the superior strata of the epithelium, and some dendritic melanocytes could also be observed. Multiple small foci of invasive malignant melanoma were also present in the superficial portion of the lamina propria. Vascular and perineural invasion were not detected. Histopathological aspects of the lesion are illustrated in Figures 1C, D. Computerized tomography and cervical ultrasound showed no abnormalities in parotid, thyroid, and

lymph nodes. Additional imaging investigation revealed no distant metastasis.

Culture and Characterization of Human Mucosal Melanoma Cells (MEMO)

Culture of mucosal melanoma resulted in cell growth from the explants in 48 hours. After 5–7 days, a cell monolayer was established. Cells were large with spindle, polyhedral, and star-like phenotypes (Figs. 1E, F). A few cells showed long cytoplasmic prolongations with fine and dark granules on their extremities (Fig. 1F). Other cells exhibited dark granules in their cytoplasm (Fig. 1E). All cells expressed S-100 (strong expression) (Fig. 1G), HMB-45 (Fig. 1H), and Melan-A. Transmission electron microscopy of the cells cultured revealed melanosomes at various stages, including immature melanosomes and swollen rough endoplasmic reticulum (Fig. 1I).

DISCUSSION

Oral mucosal primary melanomas are rare lesions, comprising 0.2%–8% of all melanomas and 0.5% of all malignancies.^{12–16} The present report refers to a case of oral melanoma still in its early stages of invasion, which occurred in a male patient in his eighth decade of life, not commonly observed. The presence of junctional activity and transmucosal migration are some of the features that favor diagnosis of a primary oral melanoma.

Controversy surrounds the role of preexisting melanosis before development of oral mucosal melanoma, but anecdotal reports on possible transformation of benign oral pigmentation to primary oral melanoma exist.^{4,10} This information may indicate that a pigmented lesion with transformed melanocytes and very slow growth rate could have been present previous to the present diagnosis. Yet, literature data state that more than one-third of oral melanomas develop from melanotic lesions, which might host the neoplastic radial growth phase many months before the diagnosis of melanoma.⁷

The pathogenic mechanisms of oral mucosal melanoma development are yet poorly understood because of the rarity of the lesion and the difficulties in obtaining fresh tissue for molecular studies. Chang et al¹⁷ reported establishment and characterization of a melanoma cell line and phenotypic and immunophenotypic aspects of the cells reported herein are similar to their work. The development of a new cell line derived from an oral mucosal melanoma opens up new avenues for studies and understanding of this disease, as they may keep the main genetic alterations present in the tumor.

The new cell line derived from an oral melanoma (MEMO cells) shown in our study possesses morphological features, ultrastructure, and differentiation markers typical of melanoma cells (S-100, melan-A, and HMB-45). They also exhibited characteristics of neoplastic cells, such as rapid replication under culture conditions. Molecular characterization of this cell line will now be important for the development of new functional studies.

Tagawa et al¹⁸ also reported the establishment of a cell line derived from an oral melanoma, however, the melanoma cells were obtained from pleural fluids of the metastatic tumor and probably, their genetic characteristic might be different

from cells grown out of primary melanoma as the one shown in our work. Nonetheless, Tagawa et al¹⁸ have been performing several studies on these cells, which have been revealing some interesting molecular aspects of the disease.

The successful establishment of a new oral mucosal melanoma cell line (MEMO) in our laboratory will serve to develop studies comparing the genetic alterations of these cells with alterations already described in skin melanomas for a better understanding of the mysterious mechanisms of oral mucosal melanomas, which are reported to have distinct biological behavior. This effort may in future lead to identification of molecular targets for the development and trial of new chemotherapeutic drugs and multimodality therapies.

REFERENCES

1. Allen AC, Spitz S. Malignant melanoma: clinicopathologic analysis of the criteria for diagnosis and prognosis. *Cancer*. 1953;6:1–45.
2. Chang AE, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84836 cases from past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer*. 1998;83:1664–1678.
3. Hicks MJ, Flaitz CM. Oral Mucosal melanoma: epidemiology and pathology. *Oral Oncol*. 2000;36:152–169.
4. Garzino-Demo P, Fasolis M, Maggiore GM, et al. Oral mucosal melanoma: a series of case reports. *J Craniomaxillofac Surg*. 2004;32:251–257.
5. Regezi JA, Hayward JR, Pickens TN. Superficial melanomas of oral mucous membranes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1978;45:730–740.
6. Manolidis S, Donald PJ. Malignant mucosal melanoma of the head and neck: review of the literature and report of 14 patients. *Cancer*. 1997;80:1373–1386.
7. Rapini RP, Golitz LE, Greer RO Jr, et al. Primary malignant melanoma of the oral cavity. A review of 177 cases. *Cancer*. 1985;55:1543–1551.
8. Lourenço SV, A MS, Sotto MN, et al. Primary oral mucosal melanoma: a series of 35 new cases from South America. *Am J Dermatopathol*. 2009;31:323–330.
9. Batsakis JG, Suarez P, El-Naggar AK. Mucosal melanomas of the head and neck. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1998;107:626–630.
10. Kahn MA, Weathers DR, Hoffman JG. Transformation of a benign oral pigmentation to primary oral melanoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 2005;100:454–459.
11. Gonzales-Garzia R, Gias L, Martos PL, et al. Melanoma of the oral mucosa. Clinical cases and review of the literature. *Med Oral Cir Bucal*. 2005;10:264–271.
12. Rapis AD, Apostolidis C, Vilos G, et al. Primary malignant melanoma of the oral mucosa. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61:1132–1139.
13. Lopez-Graniel CM, Ochoa-Carrillo FJ, Meneses-Garcia A. Malignant melanoma of the oral cavity: diagnosis and treatment experience in a Mexican population. *Oral Oncol*. 1999;35:425–430.
14. Chidzonga MM, Mahomva L, Marimo C, et al. Primary malignant melanoma of the oral mucosa. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65:1117–1120.
15. Batsakis JG, Suarez P. Mucosal melanomas: a review. *Adv Anat Pathol*. 2000;7:167–180.
16. Barker BF, Carpenter WM, Daniels TE, et al. Oral mucosal melanomas: the WESTOP Banff workshop proceedings. Western Society of Teachers of Oral Pathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997;83:672–679.
17. Chang KW, Lim SC, Chao SY, et al. Establishment and characterization of an oral melanoma cell line (ME). *Oral Oncol*. 2001;37:301–307.
18. Tagawa T, Yatani R, Nishioka H, et al. Primary malignant melanoma of the oral cavity. Case report and establishment of melanoma cell line. *Int J Oral Surg*. 1981;10:16–20.