HELENA OLEGÁRIO DA COSTA

**Melanomas extensivo-superficiais
regressivos e não-regressivos finos : análise
da densidade microvascular utilizando-se os
marcadores D2-40 e CD31**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Dermatologia
Orientador: Prof. Dr. Cyro Festa Neto

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Helena Olegário da

Melanomas extensivo-superficiais regressivos e não-regressivos finos : análise da densidade microvascular utilizando-se os marcadores D2-40 e CD-31 / Helena Olegário da Costa. -- São Paulo, 2008.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Dermatologia.

Área de concentração: Dermatologia.

Orientador: Cyro Festa Neto.

Descritores: 1.Melanoma 2.Regressão neoplásica espontânea 3.Histologia
4.Prognóstico 5.Neovascularização patológica 6.Linfangiogênese

USP/FM/SBD-250/08

DEDICATÓRIA

Ao meu amado pai, a quem devo tudo.

AGRADECIMENTOS

À minha querida mãe, sempre presente e dócil, em todos os momentos.

À minha muito querida irmã, que com sua grande sensibilidade e inteligência, esteve sempre ao meu lado, e foi responsável pela revisão.

Ao Professor Cyro Festa Neto, meu eterno mestre.

Ao Cyro, meu grande amigo.

À Prof^a. Mirian Nacagami Sotto, que, com sua imensa capacidade e incansável dedicação, teve participação fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Evandro Rivitti, por todos os ensinamentos e por me permitir desenvolver este trabalho no seu serviço.

À Prof^a. Neusa Yurico Sakai Valente, que sempre me ensinou com enorme competência e extrema gentileza.

Ao Prof. José Antônio Sanches Jr., pela oportunidade de participar do Ambulatório de Oncologia Cutânea e por sempre me incentivar a seguir esse caminho, com sua integridade e bondade.

À Prof^a. Zilda Najjar Prado de Oliveira, pelo freqüente apoio e incentivo.

Ao Prof. Eugênio Raul de Almeida Pimentel, pelos ensinamentos.

Ao Prof. Luís Carlos Cucé, que desde o início me incentivou.

À Dra Sílvia Vanessa Lourenço , pela grande capacidade e bondosa ajuda na montagem das fotografias.

Ao Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, pela grande ajuda na elaboração deste trabalho.

Aos meus colegas do Ambulatório de Oncologia Cutânea, pela amizade e colaboração .

Aos meus queridos amigos , Drs. Raquel Keller, Régia Celi Patriota de Sica, Cristina Martinez Zugaib Abdalla, Adriana Pessoa Mendes Eris, Walmar Roncalli de Oliveira, Letícia Cardoso Secco, Luciana Conrado, Ana Paula Gomes Meski, Beni Moreinas Grinblat, Cristine Guarnieri Munia, Maria Helena Garrone e Gustavo Alonso, pelo imenso apoio .

À Prof^a. Débora Castanheira, que contribuiu com sua amizade e seus enormes conhecimentos neste tema.

Ao Prof. João Pereira Duprat Neto e Prof. Francisco Aparecido Belfort, pelos grandes ensinamentos e incentivo.

Ao Prof. Fernando Augusto de Almeida, pelas grandes contribuições.

À bióloga Ana Maria Gonçalves da Silva, pelo belo trabalho realizado com a imunohistoquímica.

Às biólogas do Laboratório de Dermatopatologia, Maria Cristina Galhardo, Jaqueline Maria Cruz Aragão e Ivete Izabel Torres Elias, pela ajuda imensa, com presteza e carinho.

À Andrea Luciene Tinoco, pela grande ajuda no levantamento dos dados.

À Sra. Eli Maria de Freitas Ferreira, pelo freqüente apoio.

Às funcionárias da biblioteca, Sra Ângela da Silva Bezerra e Kátia Clemente de Lima, pela grande presteza.

Às minhas secretárias, Érika e Lídia, que tanto me ajudaram.

À todos os funcionários e colegas do Departamento de Dermatologia, que colaboraram de maneira indireta com esse trabalho.

Aos pacientes que sofrem dessa difícil doença, e a enfrentam tão bravamente.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço 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. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1 Melanoma: epidemiologia	7
3.2 Melanoma: fatores de risco	9
3.3 Melanoma: características clínicas e histopatológicas	10
3.4 Melanoma: fatores prognósticos	12
3.5 Regressão espontânea em tumores	13
3.6 Regressão espontânea em melanoma	14
3.6.1 Incidência de regressão espontânea em melanoma	14
3.6.2 Aspectos clínicos da regressão em melanoma	18
3.6.3 Histopatologia do fenômeno regressivo	18
3.6.4 Prognóstico em regressão de melanoma	19
3.6.5 Mecanismos de regressão	22
3.6.6 Mediação imune na regressão espontânea em melanoma	24
3.7 Angiogênese e linfangiogênese em melanoma	27
3.7.1 Angiogênese	27
3.7.2 Linfangiogênese	30
4. MÉTODOS	33
4.1 Casuística	34
4.2 Métodos	35
4.2.1 Análise histopatológica	35
4.2.2 Técnica imunoistoquímica	36
4.2.3 Quantificação da densidade microvascular por análise de imagem ...	42
4.3 Método de análise estatística dos resultados	44
4.4 Aspectos ético-legais	44

5. RESULTADOS.....	45
5.1 Densidade microvascular geral.....	48
5.1.1 Comparação das médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) entre os melanomas regressivos e não regressivos ..	48
5.1.2 Comparação das densidades microvasculares gerais (DMVG) médias entre as diferentes áreas do mesmo melanoma regressivo...	49
5.1.3 Comparação das médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) considerando-se a mesma fase de crescimento entre melanomas regressivos e controles não-regressivos.	50
5.1.4 Comparação das médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) entre as fases radial e vertical de crescimento em cada grupo de melanomas	51
5.1.5 Médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório intra e peritumoral em cada grupo de melanomas (regressivos e não-regressivos).....	51
5.2 Densidade microvascular linfática.....	52
5.2.1 Comparação das médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) entre melanomas regressivos e não regressivos .	52
5.2.2 Comparação das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) médias entre as diferentes áreas do mesmo melanoma regressivo.....	53
5.2.3 Comparação das médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL), considerando-se a mesma fase de crescimento entre melanomas regressivos e controles não-regressivos	54
5.2.4 Comparação das médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) entre as fases radial e vertical de crescimento em cada grupo de melanomas (regressivos e não-regressivos).....	55
5.2.5 Médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório intra e peritumoral em cada grupo de melanomas (regressivos e não-regressivos).....	56
5.3 Média de tempo de seguimento, positividade do linfonodo sentinela e presença de metástases linfonodais e à distância dos pacientes estudados.	56
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÕES	69
8. ANEXOS	71
9. REFERÊNCIAS.....	79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Cortes histológicos dos melanomas regressivos, representativos da lesão e das áreas de regressão, assim como dos tumores sem regressão, foram submetidos à técnica imunoistoquímica para marcação de células endoteliais linfáticas, utilizando-se o anticorpo monoclonal de camundongo anti-D2-40 humano39
- Figura 2** - Cortes histológicos dos melanomas regressivos, representativos da lesão e das áreas de regressão, assim como dos tumores sem regressão, foram submetidos à técnica imunoistoquímica para marcação das células pan-endoteliais, utilizando-se o anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD31 humano41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Melanomas extensivo-superficiais regressivos e não-regressivos: características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas. Grupos separados conforme o marcador utilizado: CD31 para vasos sanguíneos e D2-40 para vasos linfáticos.	47
Tabela 2.	Médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) em melanomas extensivo- superficiais regressivos e não regressivos.....	48
Tabela 3.	Densidades microvasculares gerais médias (DMVG) nas diferentes áreas do mesmo melanoma extensivo-superficial regressivo	49
Tabela 4.	Comparação das médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) considerando-se a mesma fase de crescimento entre melanomas extensivo-superficiais regressivos e controles não-regressivos	50
Tabela 5.	Comparação das médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) entre as fases radial e vertical de crescimento em cada grupo de melanomas (regressivos e não- regressivos), individualmente ..	51
Tabela 6.	Médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) em melanomas extensivo- superficiais regressivos e não-regressivos	52
Tabela 7.	Densidades microvasculares linfáticas médias (DMVL) nas diferentes áreas do mesmo melanoma extensivo-superficial regressivo...	53
Tabela 8.	Comparação das médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) considerando-se a mesma fase de crescimento entre melanomas extensivo-superficiais regressivos e controles não-regressivos	54
Tabela 9.	Comparação das médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) entre as fases radial e vertical de crescimento em cada grupo de melanomas extensivo- superficiais (regressivos e não-regressivos), individualmente	55
Tabela 10.	Média de tempo de seguimento, positividade do linfonodo sentinela e metástases linfonodais e à distância dos pacientes com melanomas extensivo- superficiais regressivos e não-regressivos incluídos no estudo	57

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Melanomas extensivo-superficiais regressivos e não- regressivos: Características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas	72
Anexo 2 - Médias totais das densidades microvasculares linfáticas e gerais utilizadas nas comparações realizadas entre os melanomas extensivo-superficiais regressivos e não- regressivos, e densidades microvasculares linfáticas e gerais médias das áreas regressivas e não- regressivas de um mesmo melanoma regressivo utilizadas nas comparações realizadas neste estudo	74
Anexo 3 - Médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório intratumoral em cada grupo de melanomas extensivo- superficiais (regressivos e não regressivos).	76
Anexo 4 - Médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório peritumoral em cada grupo de melanomas extensivo-superficiais (regressivos e não-regressivos).	76
Anexo 5 - Médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório intratumoral em cada grupo de melanomas extensivo- superficiais (regressivos e não-regressivos)	77
Anexo 6 - Médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório peritumoral em cada grupo de melanomas extensivo- superficiais (regressivos e não-regressivos)	77
Anexo 7 - Tempo de seguimento , positividade do linfonodo sentinela e presença de metástases linfonodais e à distância nos pacientes com melanomas extensivo-superficiais regressivos e não-regressivos.....	78

RESUMO

Costa HO. *Melanomas extensivo-superficiais regressivos e não-regressivos finos: análise da densidade microvascular utilizando-se os marcadores D2-40 e CD31* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2008. 95p.

Introdução: O significado prognóstico do fenômeno de regressão espontânea em melanoma, especialmente nas lesões finas, tem sido controverso. Estudos recentes sugerem que regressão extensa e tardia (fibrótica) possa estar relacionada a pior prognóstico. Linfangiogênese e angiogênese predizem metástase em melanoma.

Objetivos: Analisar a densidade microvascular linfática e panvascular em melanomas extensivo-superficiais finos (Breslow $\leq$ 1,0 mm), comparando: melanomas regressivos e não-regressivos, área regressiva e não-regressiva de um mesmo tumor, os diferentes estágios de regressão (precoce ou inflamatória e tardia) de um mesmo tumor e correlacionar angiogênese e linfangiogênese a fase de crescimento tumoral. **Métodos:** Análise retrospectiva, histopatológica e estudo imunoistoquímico de melanomas com os anticorpos monoclonais D2-40 (37 tumores, sendo 16 regressivos e 21 não-regressivos como controles) e CD31 (29 tumores, sendo 13 regressivos e 16 não regressivos como controles), e posterior quantificação da densidade microvascular por análise de imagem. **Resultados:** Foi encontrada maior densidade microvascular linfática na fase tardia de regressão quando comparada à área dos melanomas regressivos que não apresentava regressão (controle interno). **Conclusões:** A fase tardia da regressão espontânea nos melanomas finos apresentou maior densidade microvascular linfática, fato que pode relacioná-la a pior prognóstico, já que densidade microvascular linfática estaria relacionada a risco aumentado de disseminação metastática. Essa suposição necessita ser confirmada por um maior seguimento dos nossos casos para detecção de metástases linfonodais.

Descritores: 1.Melanoma 2.Regressão neoplásica espontânea 3.Histologia 4.Prognóstico 5.Neovascularização patológica 6.Linfangiogênese

SUMMARY

Costa HO. Thin regressive and non-regressive superficial spreading melanomas: microvascular density analysis using the markers D2-40 and CD31 [dissertation]. Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2008. 95p.

Introduction: The prognostic significance of spontaneous regression in melanoma, especially thin lesions, has been a controversial issue. Recent studies suggest that extensive and late regression may be related to worse prognosis. Angiogenesis and lymphangiogenesis predict metastatic spread in melanoma. **Objectives:** To quantify lymphatic and panvascular microvascular density in thin (Breslow $\leq 1,0$ mm) superficial spreading melanomas comparing: regressive and non-regressive melanomas, regressive and non-regressive areas from the same tumor; early and late histological stages of regression in the same tumor and to correlate angiogenesis and lymphangiogenesis and tumor growth phase. **Methods:** We conducted retrospective study, histological examinations and immunohistochemical analyses using the monoclonal antibodies D2-40 (37 melanomas, 16 regressive and 21 non-regressive as controls) and CD31 (29 melanomas, 13 regressive and 16 non-regressive as controls) with subsequent quantification of microvascular lymphatic and panvascular density by image analysis. **Results:** We found greater lymphatic microvascular density in the late stage of regression compared with non-regressive area (internal control) of regressive melanomas. **Conclusions:** The late stage of spontaneous regression in thin melanomas showed greater lymphatic microvascular density and this may be related to worse prognosis as lymphatic microvascular density is related with increased risk of metastatic spread. This supposition must be confirmed by a longer follow-up for detection of lymph node metastases.

Descriptors: 1.Melanoma 2.Spontaneous neoplasm regression 3.Histology 4.Prognosis 5.Pathologic neovascularization 6.Lymphangiogenesis

1. INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é um tumor melanocítico cuja incidência e mortalidade estão em ascensão em todo o mundo. É um dos cânceres mais comuns em adultos jovens e a morte ocorre numa idade mais precoce do que por qualquer outra malignidade, representando um problema substancial de saúde pública. O prognóstico dos pacientes com melanoma depende do estadiamento do tumor à época do diagnóstico e é normalmente baseado no microestadiamento e na avaliação clínico - radiológica para metástases (Dadras et al., 2005).

Entre os inúmeros parâmetros prognósticos, a espessura tumoral é o mais sensível em prever o risco de metástase. Entretanto, ainda é difícil de se determinar o prognóstico para pacientes com melanoma de maneira individual, uma vez que melanomas finos também podem desenvolver metástases letais (Dadras et al., 2005). A biópsia do linfonodo sentinela é utilizada para detectar metástases nos pacientes com melanoma. Essa técnica, porém, pode resultar em vários graus de morbidade (Wrone et al., 2000; Temple et al., 2002). Indicadores prognósticos mais acurados para metástase em melanoma, são, portanto, necessários.

O significado prognóstico do fenômeno de regressão espontânea em melanomas, particularmente nos finos, tem sido assunto controverso nos últimos anos (Kaur et al., 2007).

Na literatura não há estudos que correlacionem regressão espontânea em melanoma a linfangiogênese e angiogênese de maneira concomitante.

Muitos estudos recentes sugerem que angiogênese e linfangiogênese predizem disseminação metastática em melanoma. Alguns desses estudos indicam que o grau de linfangiogênese tumor-associada pode servir como um novo indicador para metástase linfonodal (Dadras et al.,2005).

A escassez de estudos nessa área nos estimulou a fazer este trabalho, que correlaciona densidade microvascular linfática e panvascular a regressão em melanoma.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

1. quantificar a densidade microvascular linfática e panvascular, comparando melanomas extensivo-superficiais finos (índice de Breslow $\leq 1\text{mm}$) regressivos e não regressivos;
2. quantificar a densidade microvascular linfática e panvascular, comparando a área regressiva e não regressiva e os diferentes estágios de regressão (precoce e tardia) de um mesmo tumor;
3. correlacionar linfangiogênese e angiogênese à fase de crescimento tumoral.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Melanoma: epidemiologia

A incidência do melanoma cutâneo vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, resultando num crescente problema de saúde pública. (Gray-Schopfer et al., 2007).

Na Austrália, a incidência é a maior do mundo, chegando, na população acima de 50 anos, a 1 em 19 para homens e 1 em 25 para mulheres (Markovic et al., 2007).

De acordo com dados do National Cancer Institute dos Estados Unidos da América, em 2000, 629.822 norte-americanos (304.097 homens e 325.725 mulheres) vivos tiveram história de melanoma (Ries et al., 2000; Markovic et al., 2007). A incidência de melanoma aumentou, de 1973 a 2002, 270%. O risco para desenvolver a doença também tem aumentado continuamente: era de 1 em cada 1.500 norte-americanos em 1935, passou a 1 em 250 em 1980, chegando, atualmente, a 1 em cada 60 (Ries et al., 2000; Rigel et al., 2000; Rigel e Carucci, 2000; Markovic et al., 2007).

Foram estimados 108.230 novos casos de melanoma para 2007 nos Estados Unidos . A chance individual de desenvolver melanoma é de 1 para 33 (American Melanoma Foundation, 2007). Homens têm 1,5 vez mais chances de desenvolver melanoma do que mulheres (Ries et al., 2000; Markovic et al., 2007).

Paralelamente à elevação da incidência há um aumento da mortalidade relacionada ao melanoma. Em 2007, 8.110 mortes foram atribuídas ao melanoma nos Estados Unidos (5.220 em homens e 2.890 em mulheres) (American Melanoma Foundation, 2007).

No Brasil, a letalidade é também elevada e vem aumentando, porém sua incidência é baixa, embora também em ascensão: a estimativa do número de casos novos de melanoma para o ano de 2008 é de 2.950 em homens e 2.970 em mulheres (INCA, 2008).

A sobrevida média estimada em cinco anos é de 73% nos países desenvolvidos, enquanto que, nos países em desenvolvimento, é de 56%. A média mundial estimada é de 69%. (INCA, 2008).

Melanoma acomete indivíduos jovens e de meia-idade, ao contrário da maioria dos outros tumores sólidos, que afetam principalmente adultos mais velhos. A idade média do diagnóstico do melanoma é de 57 anos, e a média de idade na morte é 67 anos. A incidência aumenta linearmente após os 15 anos até os 50 anos e, depois, diminui, especialmente em mulheres. Aproximadamente metade incide entre 35 e 65 anos, e ao redor de 80% ocorrem entre 20 e 74 anos (Ries et al., 2000; Markovic et al., 2007).

A distribuição dos locais de ocorrência do tumor é sexo-dependente: as áreas mais comuns são o dorso para os homens e os braços e pernas para as mulheres (Boyle et al., 1995; Tsai et al., 2005; Markovic et al., 2007). Populações brancas apresentam um risco aproximadamente 10 vezes maior de desenvolver melanomas do que as negras, asiáticas ou hispânicas (Ries et al., 2000; Markovic et al., 2007). Isso é provavelmente devido à maior sensibilidade da pele branca à exposição solar.

Entretanto, tanto as populações norte-americanas brancas quanto as africanas têm risco similar de desenvolver melanoma plantar (Stevens et al.,1990). Melanomas extracutâneos, por exemplo, os de mucosas, são mais comuns nas populações não-brancas (Markovic et al., 2007).

3.2 Melanoma: fatores de risco

Diversos fatores de risco têm sido responsabilizados pelo aumento mundial da incidência do melanoma (Markovic et al.,2007):

- fatores ambientais ou relacionados ao estilo de vida: exposição à radiação ultravioleta solar, localização geográfica (estes, de forte evidência), bronzamento artificial, obesidade, ocupação (estes, de fraca evidência), estrógenos, uso de álcool, tabagismo, ingestão de café e vitaminas A e E (fatores em investigação).
- fatores do hospedeiro: número de nevos, nevos displásicos, história familiar de melanoma, imunossupressão, sensibilidade solar ou incapacidade de se bronzear, olhos verdes ou azuis, cabelos louros ou vermelhos (forte evidência), história pessoal de outro câncer da pele, status sócio-econômico mais elevado, cabelos castanhos, sexo masculino, idade da menarca e paridade (fraca evidência) e gestação (em investigação).

3.3 Melanoma: características clínicas e histopatológicas

Os melanomas cutâneos são classificados clinicamente como: extensivo superficial, nodular, lentigo maligno e lentiginoso acral. Alguns casos mostram tamanha heterogeneidade, que nem sempre podem ser classificáveis (Heenan et al., 1984; Barnhill et al., 2004). Há também variedades não-usuais, ou mais raras, apresentadas adiante.

Extensivo superficial é o tipo mais comum de melanoma cutâneo, respondendo por aproximadamente 70% dos casos. Ocorre mais freqüentemente na região posterior das pernas de mulheres e no dorso dos homens (Newel et al., 1988). Esses tumores são normalmente encontrados em áreas de pele exposta, particularmente em áreas de exposição solar intermitente. Usualmente mostram disseminação pagetóide proeminente e são compostos de células epitelióides (Crowson et al., 2001). Por convenção, melanomas do tipo extensivo superficial se estendem, além do componente dérmico, lateralmente por pelo menos três cones epiteliais (Clark et al., 1969). Podem surgir *de novo* ou em associação com um nevo.

Melanomas nodulares respondem por 5% dos melanomas e, mais freqüentemente, ocorrem no tronco e membros de pacientes na quinta ou sexta décadas de vida, normalmente afetando mais homens do que mulheres (Cox et al., 1996; Barnhill e Mihm, 1993). São freqüentemente ulcerados e, quando amelanóticos, podem ser confundidos com uma neoplasia vascular. No momento do diagnóstico, eles não apresentam uma fase radial de crescimento que comprometa mais de três cones epiteliais (Clark et al., 1969), apenas uma fase vertical. Não são usualmente associados a regressão ou nevo (Crowson et al., 2001).

Melanoma lentiginoso acral é incomum, respondendo por 5% dos melanomas entre a população branca. Embora seja incomum em todos os grupos étnicos, é o tipo de melanoma mais comum entre pacientes asiáticos, hispânicos e descendentes de africanos (Cascinelli et al., 1994; Kato et al., 1996; Chen et al., 1999; Luk et al., 2004; MacKie, 1985). Porém, a incidência geral de melanoma nesses grupos étnicos é baixa se comparada à incidência nos pacientes brancos. Melanoma lentiginoso acral ocorre em pele glabra e adjacente dos dedos, palmas e plantas (Cascinelli et al., 1994; Barnhill et al., 1993). Melanomas digitais normalmente acometem o leito ungueal do hálux ou primeiro quirodáctilo e, mais freqüentemente, afetam pessoas mais idosas, com predominância do sexo feminino (O’Leary et al., 2000).

Melanomas do tipo lentigo maligno respondem por 4 a 15% dos melanomas cutâneos e estão relacionados à exposição solar de longa data e idade avançada (Flotte e Mihm, 1999). Histologicamente mostram epiderme atrófica, são compostos por células melanocíticas atípicas, inicialmente isoladas e posteriormente em ninhos dispostos ao longo da junção dermo-epidérmica. Na sua progressão, pode haver invasão de estruturas mais profundas. As células tumorais normalmente se estendem aos folículos pilosos. Lentigos malignos mostram intensa elastose solar na derme. (Markovic et al., 2007).

Variantes não usuais de melanoma cutâneo

Variantes não usuais de melanoma são raras e podem ser confundidas com neoplasias epiteliais ou mesenquimais. Essas variantes têm, geralmente, comportamento similar aos tipos convencionais de melanoma quando fatores prognósticos como profundidade de invasão são levados em consideração. É importante conhecer sua

existência, para evitar confusões diagnósticas com outro tumor ou cicatriz, no caso do melanoma desmoplásico. Exemplos importantes dessas variantes são: melanoma desmoplásico, melanoma de células balonizadas, melanoma mixóide, melanoma de células em *anel de sinete*, melanoma osteogênico, melanoma rabdóide (Markovic et al., 2007).

3.4 Melanoma: fatores prognósticos

Na avaliação da prognose do melanoma, são analisados parâmetros clínicos — como idade, sexo, diâmetro da lesão, local de acometimento e ulceração — e histológicos: subtipos, níveis de invasão de Clark, espessura de Breslow, situação das margens de segurança, índice de mitoses, fase de crescimento (radial ou vertical), ulceração, presença de infiltrado linfocitário, invasão neural, angiolinfática e regressão tumoral. Não há definição estatística clara sobre a significância de cada um desses fatores independentemente ou se há interação entre eles (MacKie, 2000).

Dentre os inúmeros parâmetros, a espessura tumoral ainda é, atualmente, o mais sensível para se prever o risco de desenvolvimento de metástases em melanoma cutâneo (Dadras et al., 2005; MacKie, 2000). Entretanto, o prognóstico individual de cada paciente portador de melanoma é ainda difícil de se determinar, já que os finos também podem evoluir com metástases letais (Kalady et al., 2003). Novos indicadores prognósticos mais acurados de possibilidade de metástases são necessários. Fenômeno regressivo como fator prognóstico ainda permanece controverso.

3.5 Regressão espontânea em tumores

Tumores benignos e malignos podem envolver espontaneamente. Regressão espontânea implica em perda de massa tumoral na ausência de fatores exógenos que contribuam para tal. Neoplasias que regredem completamente sem intervenção médica constituem evento raro. Na maioria dos casos de regressão, o tumor sofre dano sub-letal, presumivelmente permitindo a persistência de alguns clones malignos num estágio proliferativo indolente (Clark, 1991; Everson e Cole, 1966).

A primeira descrição de regressão espontânea de que se tem notícia é a de Bennet, em 1899. Em 1966, Everson e Cole publicaram uma revisão completa de 176 casos de regressão espontânea de tumores desde 1900 até 1964, sendo que desses, 19 eram melanomas.

Tumores de pele que frequentemente se associam a regressão espontânea são: tumores melanocíticos (melanoma cutâneo, nevo halo); tumores epiteliais (queratoacantoma, carcinoma basocelular, carcinoma de Merkel, ou neuroendócrino, e pilomatrixoma); condições linfoproliferativas (micose fungóide, linfoma CD-30 +, papulose linfomatóide); proliferações histiocíticas (retículo-histiocitose congênita autolimitada, xantogranuloma juvenil, histiocitose X); e outros, como hemangioma capilar congênito (Ceballos e Barnhill, 1993).

3.6 Regressão espontânea em melanoma

Regressão espontânea em melanoma é caracterizada pelo desaparecimento parcial ou completo da neoplasia, sem qualquer tratamento ou, ainda, com tratamento que não seja considerado suficiente, por si só, para induzir regressão (McGovern, 1983; Ronan et al., 1987). Diz-se completa quando existe o desaparecimento total do tumor, ou parcial, quando o processo regressivo é incompleto.

O primeiro caso de regressão espontânea em melanoma foi descrito por Sumner, em 1953. Em 1964, Smith e Stehlin publicaram um extenso estudo sobre o assunto.

3.6.1 Incidência de regressão espontânea em melanoma

Melanoma cutâneo representa apenas 1% a 2% de todos os cânceres nos Estados Unidos, mas responde por 11% de todos os casos de regressão tumoral (Everson e Cole; 1966). Portanto, a incidência de regressão em melanoma é pelo menos seis vezes maior do que a esperada para cânceres em geral. Essa característica é compartilhada por dois outros tumores: neuroblastoma e carcinoma de células renais (King et al., 2001). O estudo do fenômeno de regressão nesses tumores pode prover informações importantes quanto ao mecanismo da relação tumor-hospedeiro.

Regressão parcial é definida como substituição focal da lesão por uma cicatriz, não relacionada a biópsia prévia (Fontaine et al., 2003) e é a forma mais comum tendo sido documentada em grandes séries .

Em se tratando de melanomas primários invasivos de todas as espessuras, regressão parcial é um achado que apresenta prevalência entre 10% a 35% (King et al., 2001). Melanomas finos (< 1 mm), mostram área de regressão focal em

7% a 61% (Abramova et al., 2002). Em melanomas finos com metástases coexistentes, a frequência de regressão da lesão primária é da ordem de 85-100% (Shaw et al., 1989).

Regressão completa do melanoma cutâneo primário é uma ocorrência rara, com apenas 40 casos bem documentados na literatura de língua inglesa (Emanuel et al., 2008) (High et al., 2005). A incidência de melanoma metastático com lesão cutânea primária desconhecida ou completamente regressiva foi estimada entre 2,5% a 15% (Gromet et al., 1978; Paladugu e Yonemoto, 1983; Balch e Houghton., 1992; Emanuel et al., 2008).

Os critérios para o diagnóstico de melanoma primário completamente regressivo foram estabelecidos inicialmente por Smith e Stehlin (1964) e modificados, mais tarde, por McGovern (1983) e Ronan e colaboradores (1988). Todos os critérios devem ser preenchidos:

- 1- História e/ou evidência clínica de uma lesão pigmentada situada em área drenada pelos linfonodos envolvidos pelo tumor;
- 2- Ausência de qualquer outra lesão primária identificável pela história ou exame físico que pudesse representar a lesão original de melanoma;
- 3- Presença de alteração atípica, pigmentada ou despigmentada, no sítio da lesão primária presumida não tratada, apresentando todas, ou a maioria das características histológicas típicas associadas a regressão encontradas na biópsia: epiderme atenuada, melanófagos dérmicos, infiltrado inflamatório linfocítico ou crônico, proliferação vascular reativa e fibrose;

- 4- Ausência histológica de células de melanoma cutâneo nas lesões excisadas. Cortes seriados do sítio primário completo são importantes para confirmar a ausência de pequenos focos residuais de células malignas.

Melanoma metastático com lesão primária oculta pode ser explicado por completa regressão da lesão primária. Porém, em alguns casos, foram observados restos de células névicas no tecido nodal (Ridolfi et al.,1977; Holt et al.,2004). É possível que tais casos representem degeneração maligna de restos de células névicas preexistentes nos linfonodos (Das Gupta et al.,1963), embora isso ainda permaneça puramente especulativo.

Uma possibilidade que também não pode ser desprezada é a de que um melanoma cutâneo possa regredir completamente e não metastatizar, escapando, então, à detecção. Evidentemente, não se dispõe de incidência documentada desses casos.

Regressão espontânea de metástases de melanoma cutâneo é mais rara, sendo sua frequência reportada da ordem de 0,22% a 0,27%. A maioria dos casos de regressão espontânea de metástases de melanoma se dá em metástases cutâneas, subcutâneas e linfonodais. Regressão espontânea em metástases viscerais e pulmonares é muito rara (Menzies et al., 1997; Sroujeh et al., 1988).

Regressão espontânea ocorre mais frequentemente em homens (65%) e a média de idade é de 42 anos (24-72) (Nathanson, 1976). Ocorre preferencialmente em lesões do tronco, mais do que na cabeça, pescoço e extremidades (Kelly et al., 1985). É mais comum em melanomas finos, principalmente níveis II e III de Clark, e em tumores de espessura de Breslow menor do que 1,5 mm (Czarnetzki et al.,1984).

Num estudo de 844 casos de melanoma cutâneo, o fenômeno de regressão espontânea foi visto com frequência muito maior em melanomas do tipo extensivo superficial (27%), comparados ao lentiginoso acral (17,6%), lentigo maligno melanoma (6,5%) e melanoma nodular (2,2%) (Kelly et al.,1985). O estudo de Kelly corroborou os achados de Trau e colaboradores (1983a), que observaram 549 melanomas, dos quais 24,6% apresentavam regressão histológica. Regressão foi encontrada em 27,1% dos melanomas extensivo- superficiais e 17,4% dos lentigo maligno melanomas, e não foi identificada em melanomas nodulares. Esses estudos concordam que a regressão espontânea em melanomas malignos primários decresce em frequência com lesões progressivamente mais espessas e é extremamente rara em melanomas nodulares.

Czarnetzki e colaboradores (1984) relataram incidência de regressão clínica de 15,2% em uma série de 236 melanomas extensivo-superficiais em pacientes do noroeste da Alemanha. Esses autores encontraram que 55% dos tumores com regressão espontânea possuíam área de superfície maior do que 3 cm² comparados a 25,5% dos tumores sem regressão. Maior área de superfície de melanoma cutâneo parece ter relação direta com regressão clínica e histológica (Trau et al.,1983a).

Entre 163 melanomas extensivo- superficiais, Mc Lean e colaboradores (1979) encontraram 14,7% das lesões exibindo regressão como áreas intralesionais esbranquiçadas e deprimidas. Nesse estudo, também, essa característica morfológica apresentou correlação com o tamanho do melanoma e não com a profundidade .

3.6.2 Aspectos clínicos da regressão em melanoma

O fenômeno regressivo é um processo dinâmico e tem início como um evento focal. Pode envolver por completo a lesão do melanoma ou somente segmentos focais do tumor, resultando numa variedade de manifestações clínicas. As cores variadas (vermelho, branco e azul) presentes em melanomas malignos que sofrem regressão representam manifestações clínicas do processo regressivo (Trau et al., 1983 a).

Inicialmente, na fase precoce da regressão, o hospedeiro promove uma resposta inflamatória linfocítica contra as células do melanoma, produzindo eritema clinicamente, daí a cor vermelha. O azul corresponde a áreas de incontinência pigmentar e macrófagos carregados de melanina. O branco está relacionado ao estágio final do processo regressivo, o desenvolvimento de cicatriz e fibrose. Uma complexa mistura de cores (branco, rosa, azul, cinza) resulta quando diferentes focos de um melanoma estão em diferentes estágios de regressão (Ceballos e Barnhill, 1993).

3.6.3 Histopatologia do fenômeno regressivo

O fenômeno regressivo em melanoma cutâneo tem características espectrais. Ele tem início com um infiltrado inflamatório e culmina em cicatriz e fibrose. Os critérios para regressão histológica variam entre os autores. Entretanto, muitos patologistas baseiam seus critérios naqueles de McGovern com mínimas variações (McGovern, 1983). Tal fenômeno pode ser arbitrariamente dividido em três fases: ativa, intermediária e tardia.

Precocemente no processo regressivo, existe uma resposta inflamatória predominantemente mononuclear ao redor e por entre os ninhos melanocíticos intradérmicos ou juncionais. Células de melanoma degeneradas devem ser vistas para que possa ser estabelecida a presença de regressão ativa (a fase precoce). O citoplasma das células tumorais torna-se eosinofílico e o núcleo celular degenera (McGovern, 1983).

Uma fase intermediária é caracterizada por uma resposta inflamatória diminuída comparada à fase precoce e por proliferação fibroblástica, neoformação vascular e melanófagos. Distorção dos cones epiteliais ocorre nesse ponto da evolução da regressão. Ocasionalmente, células de melanoma cutâneo degeneradas podem ser vistas (McGovern, 1983).

Na terceira e última fase, ou fase tardia do processo regressivo, há extensa fibrose dérmica associada a uma derme papilar expandida, retificação dos cones epiteliais, ausência de células tumorais, aumento da fibroplasia com ou sem melanófagos e telangiectasia. Há diminuição de mitoses no foco de regressão (McGovern, 1983; McGovern et al., 1975; Shaw et al., 1989; Ronan et al., 1987).

3.6.4 Prognóstico em regressão de melanoma

Regressão pode ser considerada como uma extensão da resposta inflamatória resultando na destruição das células tumorais com sua eventual substituição por fibrose. Como tal, seria esperado que tivesse um efeito favorável no prognóstico. Entretanto, visões diametralmente opostas sobre o significado prognóstico da regressão têm sido publicadas (Cook, 1992).

Alguns autores (Gromet et al., 1978; Paladugu e Yonemoto, 1983; Naruns et al., 1986; Singluff et al., 1988; Blessing et al., 1990) sugerem que a presença de regressão em lesões finas esteja associada a um maior índice de recorrência e menor sobrevida. Outros (McGovern et al., 1983; Trau et al., 1983b; Cooper et al., 1985), sugerem que não esteja associada a um maior índice de recorrência.

Um grupo de autores analisou os mesmos pacientes após um longo período de acompanhamento. Observaram que a alta incidência inicial de recorrência do tumor em lesões regressivas finas foi, mais tarde, igualada pela incidência de metástases nas lesões finas não-regressivas. Diferentemente do observado no estudo de prazo mais curto, não houve, a longo prazo, diferença na sobrevida entre os dois grupos (Gromet et al., 1978; Kelly et al., 1985).

Outros estudos teceram comentários mais específicos sobre os efeitos da regressão. Ronan et al. (1987) sugeriram que regressão extensa (maior do que 77% do tumor) estava associada a melanomas metastatizantes agressivos, e aquelas lesões com menos de 77% de regressão só raramente metastatizavam.

Cooper e colaboradores, em 1985, apesar de não ter reportado efeito prognóstico ruim em regressão de uma maneira geral, consideraram a possibilidade de cicatriz extensa em melanoma estar relacionada a pior prognóstico. Clark e colaboradores (1989) observaram que apenas na fase vertical de crescimento do tumor a regressão estava associada a menor sobrevida.

Sondergard e Hou-Jensen (1985) também reportaram um significado variável da regressão dependendo da espessura do melanoma afetado. Em lesões finas (<1 mm), notaram que a regressão influenciava desfavoravelmente o prognóstico, enquanto que em lesões espessas (> 2mm) o prognóstico era melhor.

Shaw e colaboradores (1989) não notaram diferença na incidência de regressão em lesões finas estágio I metastatizantes e não metastatizantes, mas notaram presença invariável de regressão nas lesões finas com metástase linfonodal. Eles argumentaram que a presença de metástases linfonodais induziria à regressão da lesão primária.

Trau e colaboradores (1983b) atribuíram o alto índice de metástases em melanomas regressivos finos comparados aos não regressivos à falta de cortes seriados dos tumores. Com a realização de maior número de cortes, invasão mais profunda poderia ser revelada na maioria das lesões regressivas, retirando-as da categoria de finas e explicando sua maior propensão a metástase.

Sagebiel, em 1985, argumentou que regressão não está associada a menor sobrevida, embora possa existir uma maior incidência de metástase linfonodal a curto prazo. Isso implicaria na existência de uma diferença essencial nas características biológicas de alguns melanomas. Talvez aqueles melanomas associados à cronicidade da lesão cutânea primária, mostrando regressão e uma predisposição para metástase linfonodal, tenham pouca tendência a metástases sistêmicas (Naruns et al., 1986), não sendo a sobrevida a longo prazo, pior, podendo ser, ao contrário, até melhor do que a de um melanoma comparável sem regressão.

Fontaine e colaboradores, em 2003, não encontraram evidência de risco aumentado de metástase linfonodal em melanomas regressivos quando comparados aos não regressivos.

Mais recentemente, Kaur e colaboradores (2007) revisaram 146 melanomas com biópsia do linfonodo sentinela, e encontraram uma maior proporção de

indivíduos sem regressão mostrando positividade do linfonodo sentinela em comparação com aqueles que mostravam regressão.

Morris e colaboradores, em 2008, concluíram que a presença de regressão histológica no melanoma primário não é preditiva de positividade de linfonodo sentinela quando há estratificação através da espessura de Breslow, nem aumenta o risco de recorrência quando comparada a melanomas sem regressão.

A variação na interpretação do significado da regressão tem sido atribuída à falta de uniformidade na sua definição.

3.6.5 Mecanismos de regressão

Os mecanismos envolvidos na regressão tumoral são complexos. A compreensão desses mecanismos pode elucidar por que alguns tumores regredem completamente, enquanto outros, como o melanoma, mostram evidência de regressão do tumor primário concomitante à ocorrência de metástases à distância (Elston, 2004).

Os mecanismos de regressão espontânea não são completamente compreendidos, mas propõe-se incluir: mediação imune, inibição de angiogênese e apoptose. Embora a indução de regressão espontânea possa envolver múltiplos mecanismos, o resultado final parece ser diferenciação ou morte celular (Papac, 1998). Regressão tumoral pode, ainda, refletir um processo de crise genômica ou diferenciação terminal (Elston, 2004).

Crise genômica e conseqüente regressão tumoral podem resultar da inibição da telomerase (Kim, 1997). Telomerase está associada com imortalidade celular e tumorigênese. Em neuroblastoma, altos níveis de atividade de telomerase se

correlacionam com má evolução, enquanto que encurtamento de telômero tem correlação com regressão tumoral (Hiyama et al., 2003). Tumores regressivos demonstram uma redução das repetições teloméricas e configurações teloméricas anormais multicêntricas e em anel (Pathak et al., 2000).

Diferenciação terminal é um fenômeno onde o tumor sofre uma queratinização até a morte. Células diferenciadas não são mais capazes de divisão celular, e, portanto, morrem. Em células epiteliais escamosas, a diferenciação terminal se manifesta por queratinização e pode ser monitorada pela medida da expressão de citoqueratina 10, um marcador para queratinização terminal (Elston, 2004).

Crise genômica está relacionada a regressão em melanomas, enquanto diferenciação terminal associa-se a regressão em queratoacantomas (Prehn, 1996). Regressão através de crise genômica é, provavelmente, sinal de pior prognóstico se comparada à que ocorre através de diferenciação terminal, já que enquanto regressão parcial em melanomas está frequentemente associada a prognóstico pobre, regressão em queratoacantomas está associada com excelente evolução. Tal fato poderia explicar as diferenças entre melanomas e queratoacantomas regressivos. Os diferentes mecanismos de regressão podem, assim, estar relacionados ao prognóstico do tumor (Elston, 2004).

Apoptose é um mecanismo importante na regressão, mas não é pré-requisito ou por si só suficiente para a ocorrência desse fenômeno. Outros mecanismos são importantes (Elston, 2004).

A angiogênese será largamente discutida a seguir.

Regressão em melanoma parece frequentemente seguir alguns eventos mecânicos não específicos, assim como biópsia ou excisão incompleta. Alguns eventos adicionais têm sido associados a regressão: infecção local, doença auto-imune, irradiação de metástases (outras, que não a regressiva), reação transfusional e aborto (King et al., 2001).

3.6.6 Mediação imune na regressão espontânea em melanoma

A maioria dos dados disponíveis atualmente sugere que mecanismo imunológico esteja envolvido na regressão tumoral do melanoma. Evidências indiretas disso residem nas características histológicas das lesões regressivas, como o infiltrado de células mononucleares, na presença de precursores de linfócitos T citotóxicos melanoma-específicos no sangue periférico e nos casos documentados de eficácia de imunoterapia. (King et al., 2001)

Relatos da associação de fenômenos despigmentantes, tais como vitiligo e nevo halo associados ao melanoma regressivo também sugerem fatores auto-imunes dirigidos contra antígenos comuns compartilhados por células pigmentares normais e malignas (King et al., 2001).

Porcos da família *swine*, que nascem com melanoma que regride 10 semanas após o nascimento, têm sido utilizados para o estudo da regressão. Esses animais desenvolvem anticorpos que precedem ou aparecem simultaneamente com a regressão tumoral e a perda da pigmentação (Cui J et al., 1995). Em humanos com melanoma, boa correlação entre despigmentação auto-imune e melhor resposta clínica foi documentada (Nordlund e Lerner, 1979).

O ponto central do conceito da teoria da vigilância imunológica contra o câncer, formalizado por Burnet em 1970, é o de que antígenos tumorais possam ser reconhecidos por imunidade celular durante o desenvolvimento do câncer primário pela formação de linfócitos citotóxicos antígeno-específicos (CTLs), e que tal reconhecimento leve à destruição daquelas células tumorais (regressão tumoral) com o subsequente aparecimento das variantes tumorais com perda de antígeno (Saleh et al., 2003). A perda da vigilância poderia responder pela disseminação tumoral. A regressão tumoral parece ser mediada por linfócitos T possivelmente via reconhecimento de antígenos de diferenciação expressos num contexto anormal de citocinas no tumor (King et al., 2001; Bayer-Gardner et al., 2004).

Uma variedade de antígenos que são expressos especificamente pelas células de melanoma tem sido caracterizada usando-se, experimentalmente, linfócitos T melanoma-reativos, incluindo linfócitos com conhecida atividade anti-tumoral *in vivo*. Esses antígenos compreendem os de linhagem melanocítica-específicos, tais como tirosinase, gp100, Melan A/MART-1 e TRP (gp 75), e os antígenos expressos numa variedade de tipos tumorais, os quais se mostram silenciosos no tecido normal, exceto no testículo e placenta, tais como a família de genes de proteínas MAGE, BAGE, e GAGE. De cada uma dessas proteínas, inúmeros peptídeos têm sido identificados, que se ligam a uma determinada molécula MHC classe I e parecem ser potentes ativadores dos linfócitos T citotóxicos *in vitro* (Bernsen et al., 2004; King et al., 2001). Em melanoma, a perda do antígeno MART-1 em metástases de pacientes cujos melanomas primários regrediram levou à especulação de que regressão tumoral pudesse estar associada à vigilância imunológica (Saleh et al., 2003).

A análise molecular da diversidade do repertório do gene variável BV do receptor do linfócito T nos infiltrados linfocitários tumorais revelou que certas populações clonais de linfócitos T estão expandidas. A comparação da expressão BV em áreas regressivas e progressivas do mesmo melanoma primário humano mostrou diferenças significativas, que podem ser o resultado de diferentes antígenos expressos nas células tumorais das duas áreas. Essas diferenças também podem estar relacionadas à atividade funcional de certas populações clonais dos linfócitos T. Esses achados também falam a favor da ativação de células T tumor-específicas em ambas as áreas, que se tornariam inefetivas nos tumores progressivos, provavelmente devido aos mecanismos de escape tumoral (thor Straten et al.,1996) .

Um estudo recente sugere que o impacto clínico de uma resposta imune anti-tumoral seja definido largamente no sítio tumoral, onde condições microambientais ditam o estado funcional das células T (Bernsen et al., 2004). É possível que o início de uma resposta imune seja afetado pela interação de citocinas. Uma análise da transcrição do gene de citocinas em melanomas primários humanos regressivos e progressivos mostrou aumento dos níveis de transcrição para GM-CSF, interleucinas 2 e 5 em lesões regressivas. Esse resultado nos fornece evidência da associação da regressão espontânea a combinações particulares de citocinas (Wagner et al., 1998).

Lowes e colaboradores (1997) encontraram concentrações aumentadas de citocinas Th1 (IL-2 e IFN-gama) nos melanomas regressivos.

A caracterização de clones de células T isolados de lesões metastáticas com padrão Th2 sugere que a conversão de resposta Th1 para Th2 possa aumentar a progressão em direção à metástase (Kharkewitch et al., 1994) .

Em contraste com esses estudos com melanomas primários regressivos, lesões metastáticas não parecem conter mRNA para citocinas, sugerindo que as células T em metástases não estejam secretando ativamente citocinas imunestimulantes (Luscher et al., 1994).

Outras evidências de que o melanoma regressivo é imunologicamente mediado vêm de estudos mostrando que o antígeno leucocitário humano (HLA)-B22 é positivamente relacionado a regressão, enquanto que HLA-B27 e HLA-DR-1 são negativamente relacionados (Lowes et al., 1999).

Dados recentes sugerem que a ativação endógena de interferons tipo I, a infiltração de células dendríticas plasmocitóides e o recrutamento de linfócitos CXCR3+ e granzima B+ estejam envolvidos na regressão espontânea em melanoma (Wenzel et al., 2005).

3.7 Angiogênese e linfangiogênese em melanoma

3.7.1 Angiogênese

Melanomas cutâneos podem metastatizar através dos vasos sanguíneos e linfáticos dérmicos. A indução da angiogênese tumoral fornece uma possível explicação para o modo pelo qual ocorre o escape das células tumorais do seu local de origem e posterior invasão do leito vascular neo formado (Weidner et al., 1991).

Vascularização tumoral foi observada em melanomas humanos experimentalmente (Warren e Shubik, 1966) e clinicamente (Barnhill et al., 1992). A formação de novos vasos sanguíneos é uma característica proeminente dos

melanomas cutâneos humanos, indicando que esses tumores apresentam atividade angiogênica. (Mihm et al., 1975).

A observação de que células de melanoma cutâneo adquirem a capacidade de induzir ativamente o crescimento de novos vasos sanguíneos data dos primórdios da pesquisa sobre angiogênese tumoral, quando Warren e Shubik, em 1966, pela primeira vez, observaram a indução da angiogênese tumoral após o transplante de fragmentos de melanoma humano para a bochecha de um hamster. Esses resultados foram confirmados, mais tarde, por outros estudos. (Hubler e Wolf, 1976).

Srivastava e colaboradores, em 1986, usando estudos com ultrassom Doppler, detectaram fluxo sanguíneo tumoral na maioria dos melanomas com espessura maior do que 0,9 mm; tal fenômeno se mostrou raro nos tumores finos. Em outro estudo de 20 melanomas, Srivastava e colaboradores, em 1988, reportaram que a área vascular na base de melanomas com metástases loco-regionais ou sistêmicas era mais do que duas vezes maior quando comparada à do grupo de tumores livres de recorrência.

Normalmente, o início da angiogênese é observado durante a fase radial de crescimento dos melanomas cutâneos (Barnhill et al., 1992), mas é mais pronunciado com o desenvolvimento da fase vertical (Barnhill e Levy, 1993).

Um aumento na densidade microvascular média se correlacionou com progressão do melanoma (Marcoval et al, 1997; Erhard et al., 1997).

Inúmeros estudos histológicos retrospectivos reportaram uma correlação inversa entre a densidade microvascular do tumor e sobrevida livre de doença e total dos pacientes que apresentaram melanoma (Srivastava et al., 1988; Straume et al., 1999).

Um estudo prospectivo com 417 pacientes que apresentaram melanoma cutâneo mostrou que a vascularização do tumor foi o determinante mais importante da sobrevida total, tendo ultrapassado espessura tumoral (Kashani-Sabet et al., 2002).

Em contraste, Carnochan e colaboradores, em 1991, encontraram que a recorrência tumoral não poderia ser prevista por nenhum dos parâmetros vasculares (largura do vaso, superfície, densidade de volume) fosse de maneira independente ou quando combinados a outras características clínicas e histológicas. Busam e colaboradores, em 1995, compararam 60 casos de melanomas cutâneos metastatizantes e não metastatizantes e não encontraram diferença significativa no número de microvasos ou no padrão da microarquitetura vascular.

A significância clínica e prognóstica da angiogênese tumoral foi revisada por Streit e Detmar, em 2003, e permanece controversa.

Hillen e colaboradores, em 2006, investigaram angiogênese em 58 pacientes com melanoma cutâneo, através da análise da densidade microvascular (utilizando o marcador CD31) e do número de células endoteliais proliferantes (utilizando o marcador de proliferação Ki67). Eles não encontraram correlação da densidade microvascular com estágio tumoral ou sobrevida, mas sim, correlação positiva entre células endoteliais proliferantes e estágio tumoral e presença de metástases à distância.

Portanto, o valor prognóstico potencial da angiogênese tumoral em melanoma permanece incerto. Alguns desses resultados contraditórios podem ser explicados por maneiras não estandarizadas de avaliar vascularização tumoral e pelos métodos variados utilizados para a visualização dos vasos associados ao tumor (Dadras e Detmar, 2004).

3.7.2 Linfangiogênese

Melanomas cutâneos são conhecidos por sua propensão para disseminação metastática precoce através dos vasos linfáticos para os linfonodos regionais, mesmo nos estágios iniciais da invasão tumoral. Metástase linfonodal, como determinado pela análise do linfonodo sentinela, é um determinante fundamental para o estadiamento e o manejo clínico do melanoma (Balch et al., 2001).

O sistema vascular linfático cutâneo consiste de uma rede de capilares de paredes finas que drenam linfa rica em proteína dos espaços extravasculares. Os capilares linfáticos são delimitados por uma única camada de células endoteliais, e, ao contrário dos vasos sanguíneos, não apresentam uma membrana basal contínua. A linfa retorna à circulação venosa através dos vasos linfáticos coletores maiores e do ducto torácico (Dadras e Detmar, 2004). O sistema linfático se desenvolve a partir de um processo conhecido como linfangiogênese (formação de novos linfáticos).

Em contraste com os extensos estudos em angiogênese associada a melanoma, pouco ainda é conhecido a respeito dos mecanismos através dos quais as células de melanoma atingem o sistema linfático. A recente identificação dos fatores de crescimento de endotélio linfático (vascular endothelial growth factors VEGF-C e VEGF-D) e seu receptor (VEGFR-3), juntamente com a descoberta dos marcadores linfático-específicos [VEGFR-3 (Lymboussaki et al., 1998); prox-1 (Dadras e Detmar, 2004); LYVE-1 (Dadras e Detmar, 2004); D2-40 (Fukunaga, 2005; Niokasari et al., 2005)] nos têm fornecido nova luz para o estudo da formação dos vasos linfáticos tumor-associados e sua contribuição para a disseminação tumoral linfática e evolução clínica.

Um número cada vez maior de estudos clínico-patológicos tem mostrado uma correlação direta entre a expressão celular tumoral dos fatores linfangiogênicos VEGF-C ou VEGF-D e disseminação metastática tumoral em muitos cânceres humanos (Stacker et al., 2002). Poucos estudos estão disponíveis, entretanto, no que se refere à expressão de fatores linfangiogênicos por melanomas. Em um deles, células do melanoma A375 que expressam VEGF-C induziram o crescimento e invadiram os vasos linfáticos na membrana corioalantóica aviária, enquanto que células de melanoma Malme 3M, VEGF-C negativas, não provocaram esses efeitos (Papoutsis et al., 2000).

Em melanomas primários humanos, mRNA de VEGF-C e expressão protéica foram detectados (Dadras et al., 2003). VEGF-D foi detectado em células de melanoma e em vasos adjacentes às células tumorais imunopositivas, mas não em melanócitos normais ou em vasos distantes do tumor (Achen et al., 2001).

Estudos recentes em modelos tumorais animais mostraram evidência de que níveis aumentados de VEGF-C ou VEGF-D promovem linfangiogênese e disseminação tumoral linfática para os linfonodos regionais; esses efeitos podem ser suprimidos pelo bloqueio do sinal de VEGF-R (Skobe et al., 2001; Mandriota et al., 2001; He et al., 2002).

Esses resultados, em conjunto, indicam que a linfangiogênese tumor-associada, que é induzida por VEGF-C, VEGF-D ou outros fatores de crescimento não identificados, pode levar à proliferação e aumento dos vasos linfáticos intra e peritumorais que têm sido detectados em melanomas humanos (Oliver e Detmar, 2002).

Independentemente de quais fatores induzam o crescimento de novos vasos linfáticos tumorais, um aumento na linfangiogênese peri e intratumoral resulta em

um significativo pior prognóstico em melanoma cutâneo (Dadras et al., 2003). Esses dados foram confirmados por outros investigadores (Shields et al. 2004; Jain e Carmeliet, 2001).

Em outro estudo prospectivo (Dadras e Detmar, 2004), pacientes com linfonodo sentinela positivo tiveram uma área vascular linfática relativa peritumoral significativamente maior quando comparados a pacientes com linfonodo sentinela negativo. Conforme havia aumento na extensão da linfangiogênese, havia também um aumento na incidência de metástases no linfonodo sentinela, chegando a 100 % entre pacientes cuja área vascular linfática era maior do que 2%. A expressão de VEGF-C foi detectada em 88,2% dos melanomas com linfonodo sentinela positivos, comparada a apenas 44% nos tumores linfonodo sentinela negativos e foi um parâmetro significativo como indicador de metástases para o linfonodo sentinela numa análise univariada.

De um modo geral, a extensão da linfangiogênese peritumoral emerge como um novo e altamente significativo indicador de metástase para o linfonodo sentinela e pode ser usada para prever a forma microscópica mais precoce de metástase em melanoma. (Dadras e Detmar, 2004).

4. MÉTODOS

4.1 Casuística

Desenho

Realizou-se estudo retrospectivo, histopatológico, por imunoistoquímica e posterior quantificação por análise de imagem, a partir de blocos e lâminas histológicas de casos de melanomas cutâneos regressivos finos (índice de Breslow ≤ 1 mm) do tipo extensivo superficial, provenientes do acervo do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Tais exames eram de pacientes atendidos pelo Grupo de Oncologia Cutânea do Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP no período entre 1990 e 2006. Foi realizada comparação com um grupo de controles, composto por casos de melanomas não-regressivos finos (índice de Breslow ≤ 1 mm) atendidos no mesmo período.

Foi realizada a análise dos prontuários dos pacientes para o levantamento dos dados clínicos e epidemiológicos pela autora principal. A revisão dos exames anatomopatológicos foi realizada por duas patologistas experientes em melanoma e pela dermatologista pesquisadora principal.

Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo os casos de melanomas de tipo extensivo superficial finos (índice de Breslow ≤ 1 mm) histologicamente regressivos .

CrITÉRIOS de exclusão

Foram excluídos do estudo os casos de melanomas extensivo-superficiais de pacientes com albinismo, portadores de xeroderma pigmentoso, além dos casos que mostraram ulceração histológica e aqueles cujo material de exame anatomopatológico era insuficiente para a realização da análise imunoistoquímica.

4.2 Métodos

4.2.1 Análise histopatológica

A revisão histopatológica dos casos compreendeu:

- a caracterização do fenômeno regressivo em precoce ou tardio, de acordo com os critérios propostos inicialmente por McGovern (1983) e modificados conforme descrito a seguir:
 - regressão **precoce** — resposta inflamatória predominantemente mononuclear importante, ao redor e por entre os ninhos melanocíticos intradérmicos ou juncionais; células de melanoma degeneradas; ausência de melanófagos, proliferação vascular ou fibrose;
 - regressão **tardia** — ausência praticamente completa de infiltrado inflamatório, perda importante ou total de células tumorais, grande quantidade de melanófagos, proliferação vascular e fibrose importantes;

- a quantificação da extensão da fase do fenômeno regressivo precoce e/ou tardia, que muitas vezes apresentavam concomitância num mesmo caso, através da análise semi-quantitativa, tendo sido convencionados os intervalos: ausente (0), presente + (0-25%), ++ (25-50%) , +++ (> 50%);
- índices de Breslow e Clark (Breslow,1970; Clark et al.,1969);
- fase de crescimento do tumor (radial ou vertical);
- quantificação do infiltrado intra e peritumoral, através de análise semi-quantitativa, caracterizando cada tipo de infiltrado em ausente, leve, moderado ou acentuado.

4.2.2 Técnica imunoistoquímica

4.2.2.1 Imunomarcacão de células neoplásicas

Os cortes histológicos dos melanomas regressivos, representativos da lesão e das áreas de regressão, foram submetidos à técnica imunoistoquímica com os anticorpos monoclonais HMB-45 (M0634, Dako Cytomation[®], Carpinteria, CA) e MELAN-A (A103, M7196, Dako Cytomation[®], Carpinteria, CA) para melhor identificação de células neoplásicas nos sítios de regressão parcial.

Cortes histológicos de 4 µm eram colhidos em lâminas de vidro tratadas com o adesivo (3-aminopropyl) triethoxy-silane (Sigma[®], código A3648, Steinheim, Alemanha). Em seguida, eram desparafinizados em xilol e hidratados em cadeia descendente de álcoois. Procedia-se à incubação com anticorpo primário HMB-45, numa diluição de 1:150, a 4 °C por uma noite. Posteriormente, eram submetidos a

três lavagens de cinco minutos cada em *phosphate buffered saline* (PBS). O material era, então, incubado com o sistema *Envision* fosfatase alcalina (código K 1396; Dako Cytomation[®], Carpinteria, CA) por 30 minutos à temperatura ambiente. Novamente, procedia-se a três lavagens de cinco minutos em PBS. Seguiu-se revelação com o cromógeno *Liquid Permanent Red* (código K0640, da Dako Cytomation[®], Carpinteria, CA), com controle ao microscópio óptico. Os preparados histológicos eram novamente lavados em PBS e, logo após, em água destilada, sendo contracorados com hematoxilina de *Carazzi*. Eram então, secos e montados em lâminulas de vidro e resina *Permout* (Fisher Scientific[®]; código SP15-500).

Para a imunomarcação com o anticorpo MELAN-A, fazia-se a exposição antigênica em panela a vapor (*steamer*) em tampão Tris 10 mmol/L + 1 mmol/L EDTA (*ethylenedamine tetraacetic acid*), pH 9,0, previamente aquecido. Após esse procedimento, o material era lavado em água corrente, água destilada e PBS. Era, em seguida, incubado com o anticorpo MELAN-A, diluído 1:100, a 4 °C por uma noite. Depois, fazia-se o mesmo procedimento da marcação com o anticorpo HMB-45.

4.2.2.2 Imunomarcação de estruturas vasculares dérmicas

Cortes histológicos dos melanomas regressivos, representativos da lesão e das áreas de regressão, assim como dos tumores sem regressão, foram submetidos à técnica imunoistoquímica para marcação de células endoteliais linfáticas, utilizando-se o anticorpo monoclonal de camundongo anti-D2-40 humano (clone D2-40, código M3619, Dako Cytomation[®], Carpinteria, CA) (Figura 1) e para marcação das células pan-endoteliais, utilizando-se o anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD31 humano (clone JC70A, código M0823, Dako Cytomation[®], Carpinteria, CA) (Figura 2).

Figura 1:

- A-** Estágio precoce de regressão em melanoma fino (hematoxilina e eosina, 200×).
- B-** Estágio precoce de regressão em melanoma fino (D2-40).
- C-** Estágio tardio de regressão em melanoma fino (hematoxilina e eosina, 200×).
- D-** Estágio tardio de regressão em melanoma fino (D2-40).
- E-** Área de melanoma regressivo fino que não apresentava regressão (controle interno) (hematoxilina e eosina, 200×).
- F-** Área de melanoma regressivo fino que não apresentava regressão (controle interno) (D2-40).
- G-** Melanoma fino não- regressivo (hematoxilina e eosina, 200×).
- H-** Melanoma fino não- regressivo (D2-40).

Figura 1

Figura 2:

- A-** Estágio precoce de regressão em melanoma fino (hematoxilina e eosina, 200×).
- B-** Estágio precoce de regressão em melanoma fino (CD31).
- C-** Estágio tardio de regressão em melanoma fino (hematoxilina e eosina, 200×).
- D-** Estágio tardio de regressão em melanoma fino (CD31).
- E--** Área de melanoma regressivo fino que não apresentava regressão (controle interno) (hematoxilina e eosina, 200×).
- F-** Área de melanoma regressivo fino que não apresentava regressão (controle interno) (CD31).
- G-** Melanoma fino não- regressivo (hematoxilina e eosina, 200×).
- H-** Melanoma fino não- regressivo (CD31).

Figura 2

Para a imunomarcação com o D2-40 (diluição 1:100), o procedimento foi semelhante àquele com o anticorpo HMB-45.

Para a imunomarcação com o CD31, foi feito pré-tratamento do material com proteinase K (20 µg/ml), fazendo-se a diluição em PBS por 10 minutos à temperatura ambiente; eram feitas, então, lavagens em água corrente, destilada e PBS. Só então procedia-se à incubação com o anticorpo anti- CD31 (diluição 1:30), a 4 °C , por uma noite . Eram, então, realizadas três lavagens de cinco minutos cada em PBS e posterior incubação com o sistema *Envision* fosfatase alcalina (código K 1396; Dako Cytomation[®], Carpinteria, CA) por 60 minutos a 37°C. Realizava-se mais três lavagens em PBS e posterior revelação com o cromógeno *Liquid Permanent Red* (código K0640, Dako Cytomation[®], Carpinteria, CA), com controle ao microscópio óptico. Os preparados histológicos eram novamente lavados em PBS e, logo após, em água destilada, sendo contracolorados com hematoxilina de *Carazzi*. Eram então, secos e montados em lamínulas de vidro e resina *PermOUNT* (Fisher Scientific[®]; código SP15-500).

Todas as reações foram seguidas com controles positivos: casos de melanomas para os anticorpos HMB-45 e MELAN-A e casos de linfangioma para o anticorpo D2-40.

4.2.3 Quantificação da densidade microvascular por análise de imagem

As imagens dos preparados imunomarcados com os anticorpos D2-40 e CD31 foram capturadas com câmera digital Nikon (modelo Ds-Fi1) acoplada a microscópio binocular Nikon[®] (modelo Eclipse E400) com aumento de 200 X (10 X ocular e 20 X objetiva). Foram selecionadas, para captura, as áreas de maior concentração das

estruturas vasculares em questão (*hot spots*) (Depasquale e Thompson, 2005). Foram tomadas imagens de campos representativos das áreas de tumor, regressão precoce e tardia, quando presentes. Sempre que possível, foram escolhidas 10 imagens de cada uma das áreas de interesse, de cada caso. Nos casos em que não foi possível atingir tal número de campos devido ao tamanho do fragmento, todo o tecido foi amostrado. Foram documentadas, para a quantificação, estruturas vasculares da periferia do tumor. Dos casos de melanoma sem regressão, foram tomadas, sempre que possível, 10 imagens representativas das estruturas vasculares imunomarcadas do mesmo modo que para as áreas tumorais dos casos com regressão.

As imagens, digitalizadas, foram transferidas para computador compatível com o padrão IBM, com o *software* Image-Pro Plus versão 5.1 (Media Cybernetics®) instalado. Inicialmente, para cada uma das imagens, fez-se a demarcação da área dérmica a ser quantificada. Procedeu-se a seguir à contagem manual de todos os perfis vasculares ou agrupamentos celulares imunomarcados com o anticorpo D2-40 (para estruturas vasculares ou células endoteliais linfáticas). Da mesma forma foi realizado com o CD31 (para estruturas vasculares ou células endoteliais sanguíneas e linfáticas). A área total demarcada foi, então, quantificada automaticamente pelo *software*. A partir destes dados, foram obtidas a densidade microvascular linfática e densidade microvascular panvascular ou geral, definidas como a relação entre o número de estruturas imunomarcadas dividido pela área, para cada um dos casos na área tumoral (para os dois grupos de melanoma) e de regressão (modificado de Depasquale e Thompson, 2005). Fez-se, então, o cálculo das densidades microvasculares linfática e geral médias para a área tumoral total (em cada grupo) e para as áreas de regressão precoce, regressão tardia e área do tumor regressivo que não apresentava regressão. As comparações foram realizadas utilizando-se essas médias.

4.3 Método de análise estatística dos resultados

Para as variáveis contínuas, os dados são apresentados como médias, medianas, desvio padrão, mínimo e máximo. Para as variáveis categóricas, são apresentadas as frequências e porcentagens.

Para a comparação de médias entre os grupos independentes, foi utilizado o teste para amostras independentes t de Student. Para a comparação de dados pareados foi utilizado o teste T para amostras dependentes.

Todas as análises foram feitas pelo software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 15.0 (SPSS Inc., 2006).

4.4 Aspectos ético-legais

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa concedeu aprovação para a realização do estudo em 27 de outubro de 2005 (número: 881/05).

5. RESULTADOS

As características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas dos melanomas incluídos neste estudo são mostradas na Tabela 1 e Anexo 1.

Para o estudo com o anticorpos monoclonal D2-40 foram analisados 37 melanomas, sendo 16 regressivos e 21 não-regressivos como controles. Para o CD31, foram analisados 29 melanomas, sendo 13 regressivos e 16 não regressivos como controles.

Tabela 1. Melanomas extensivo-superficiais regressivos e não-regressivos: características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas. Grupos conforme o marcador utilizado: CD31 para vasos sanguíneos e D2-40 para vasos linfáticos

	CD31		D240	
	Grupo		Grupo	
	Regressivos N (%)	Não regressivos N (%)	Regressivos N (%)	Não regressivos N (%)
Sexo				
Mulheres	7 (53.8)	6 (37.5)	9 (56.3)	9 (42.9)
Homens	6 (46.2)	10 (62.5)	7 (43.8)	12 (57.1)
Cor				
Branca	12 (92.3)	16 (100.0)	15 (93.8)	21 (100.0)
Parda	1 (7.7)	0 (0.0)	1 (6.3)	0 (0.0)
Idade				
Média (Desvio padrão)	58.8 (12.9)	60.6 (17.2)	61.3 (12.7)	60.8 (16.8)
Localização				
Tronco	6 (46.2)	4 (25.0)	7 (43.8)	6 (28.6)
Membro superior	2 (15.4)	5 (31.3)	3 (18.8)	5 (23.8)
Membro inferior	4 (30.8)	4 (25.0)	5 (31.3)	6 (28.6)
Cabeça	1 (7.7)	1 (6.3)	1 (6.3)	2 (9.5)
Pescoço	0 (0.0)	2 (12.5)	0 (0.0)	2 (9.5)
Fase de crescimento				
Radial	7 (53.8)	6 (37.5)	10 (62.5)	8 (38.1)
Vertical	6 (46.2)	10 (62.5)	6 (37.5)	13 (61.9)
Clark				
II	7 (53.8)	6 (37.5)	9 (56.3)	8 (38.1)
III	4 (30.8)	9 (56.3)	5 (31.3)	12 (57.1)
IV	2 (15.4)	1 (6.3)	2 (12.5)	1 (4.8)
Infiltrado intratumoral				
Ausente	2 (15.4)	12 (75.0)	3 (18.8)	15 (71.4)
Leve	11 (84.6)	4 (25.0)	12 (75.0)	6 (28.6)
Moderado	-	-	1 (6.3)	0 (0.0)
Acentuado	-	-	-	-
Infiltrado peritumoral				
Ausente	-	-	-	-
Leve	1 (7.7)	8 (50.0)	2 (12.5)	9 (42.9)
Moderado	5 (38.5)	7 (43.8)	6 (37.5)	11 (52.4)
Acentuado	7 (53.8)	1 (6.3)	8 (50.0)	1 (4.8)

5.1 Densidade microvascular geral

As médias das densidades microvasculares utilizadas nas comparações são apresentadas no Anexo 2.

5.1.1 Comparação das médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) entre os melanomas regressivos e não regressivos

Quando se comparou as médias totais das densidades microvasculares gerais entre os melanomas regressivos e os controles não- regressivos, a diferença não se mostrou estatisticamente significativa. Esses dados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) em melanomas extensivo- superficiais regressivos e não regressivos.

Grupo	n	Média total das densidades microvasculares do tumor (DMVG média)	Valor p*
		Média (Desvio padrão)	
Regressivos	13	13.2×10^{-5} (11.4×10^{-5})	0.450
Não-regressivos	16	10.7×10^{-5} (5.6×10^{-5})	

* Teste t de Student para comparação de médias entre grupos independentes.

5.1.2 Comparação das densidades microvasculares gerais (DMVG) médias entre as diferentes áreas do mesmo melanoma regressivo

Quando se comparou as densidades microvasculares gerais médias entre as diferentes áreas de um mesmo melanoma regressivo, também não se encontrou diferença significativa. Esses dados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Densidades microvasculares gerais médias (DMVG) nas diferentes áreas do mesmo melanoma extensivo-superficial regressivo

Grupo	DMVG média	n	Média (Desvio padrão)	Valor p*
Tumores regressivos	Regressão precoce	9	9.6×10^{-5} (4.8×10^{-5})	0.111
	Regressão tardia	9	13.5×10^{-5} (3.8×10^{-5})	
	Regressão precoce	8	10.6×10^{-5} (4.9×10^{-5})	0.483
	Tumor regressivo	8	9.6×10^{-5} (2.5×10^{-5})	
	Regressão tardia	8	12.6×10^{-5} (3.6×10^{-5})	0.089
	Tumor regressivo	8	9.6×10^{-5} (2.5×10^{-5})	

* Teste t de Student para comparação de dados pareados

5.1.3 Comparação das médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) considerando-se a mesma fase de crescimento entre melanomas regressivos e controles não-regressivos.

Foram analisadas as médias totais das densidades microvasculares gerais, levando-se em conta a mesma fase de crescimento tumoral entre melanomas regressivos e controles não-regressivos. Ainda nessa comparação, não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação das médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) considerando-se a mesma fase de crescimento entre melanomas extensivo-superficiais regressivos e controles não-regressivos

Fase de crescimento tumoral	Grupo	n	Média total das densidades microvasculares gerais do tumor (DMVG média) Média (Desvio padrão)	Valor p*
Radial	Regressivos	7	15.1×10^{-5} (15.6×10^{-5})	0.524
	Não-regressivos	6	10.7×10^{-5} (5.3×10^{-5})	
Vertical	Regressivos	6	10.9×10^{-5} (2.9×10^{-5})	0.935
	Não-regressivos	10	10.7×10^{-5} (6.1×10^{-5})	

* Teste t de Student para comparação de médias entre grupos independentes

5.1.4 Comparação das médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) entre as fases radial e vertical de crescimento em cada grupo de melanomas

As médias totais das densidades microvasculares gerais foram comparadas entre as fases radial e vertical de crescimento dentro de cada grupo de melanomas, não mostrando, mais uma vez, aqui, diferença significativa (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação das médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) entre as fases radial e vertical de crescimento em cada grupo de melanomas (regressivos e não- regressivos), individualmente

Grupo	Fase de crescimento tumoral	n	Média total das densidades microvasculares gerais do tumor (DMVG média) Média (Desvio padrão)	Valor p*
Regressivos	Radial	7	15.1×10^{-5} (15.6×10^{-5})	0.531
	Vertical	6	10.9×10^{-5} (2.9×10^{-5})	
Não-regressivos	Radial	6	10.7×10^{-5} (5.3×10^{-5})	0.997
	Vertical	10	10.7×10^{-5} (6.1×10^{-5})	

* Teste t de Student para comparação de médias entre grupos independentes.

5.1.5 Médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório intra e peritumoral em cada grupo de melanomas (regressivos e não-regressivos)

As médias totais das densidades microvasculares gerais nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório intra e peritumoral foram analisadas em cada grupo de melanomas (regressivos e não-regressivos). A pequena quantidade de casos não nos permitiu, porém, comparar. Esses dados são apresentados nos Anexos 3 e 4.

5.2 Densidade microvascular linfática

As médias das densidades microvasculares linfáticas utilizadas nas comparações são apresentadas no Anexo 2.

5.2.1 Comparação das médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) entre melanomas regressivos e não regressivos

Foi realizada, aqui, a comparação das médias totais das densidades microvasculares linfáticas entre os melanomas regressivos e os controles não-regressivos. Tal comparação não mostrou diferenças. Esses dados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) em melanomas extensivo- superficiais regressivos e não-regressivos

Grupo	n	Média total das densidades microvasculares linfáticas do tumor (DMVL média)	Valor p*
		Média (Desvio padrão)	
Regressivos	16	2.1×10^{-5} (6.5×10^{-6})	0.662
Não-regressivos	21	2.2×10^{-5} (7.9×10^{-6})	

* Teste t de Student para comparação de médias entre grupos independentes.

5.2.2 Comparação das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) médias entre as diferentes áreas do mesmo melanoma regressivo

As densidades microvasculares linfáticas médias foram comparadas entre as diferentes áreas do mesmo melanoma regressivo. Desta vez notou-se uma maior densidade microvascular linfática média na fase de regressão tardia quando comparada à área do mesmo melanoma que não apresentava regressão (controle interno). Quando, porém, se comparou a fase de regressão tardia à fase de regressão precoce e a fase de regressão precoce à área do mesmo melanoma que não apresentava regressão, as diferenças não se mostraram significantes. Esses dados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Densidades microvasculares linfáticas médias (DMVL) nas diferentes áreas do mesmo melanoma extensivo-superficial regressivo

Grupo	DMVL média	n	Média (Desvio padrão)	Valor p*
Tumores regressivos	Regressão precoce	9	2.0×10^{-5} (9.8×10^{-6})	0.110
	Regressão tardia	9	2.7×10^{-5} (8.2×10^{-6})	
	Regressão precoce	10	2.1×10^{-5} (9.8×10^{-6})	0.764
	Tumor regressivo	10	2.2×10^{-5} (7.8×10^{-6})	
	Regressão tardia	11	2.6×10^{-5} (10.3×10^{-6})	0.029
	Tumor regressivo	11	2.0×10^{-5} (7.3×10^{-6})	

* Teste t de Student para comparação de dados pareados

5.2.3 Comparação das médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL), considerando-se a mesma fase de crescimento entre melanomas regressivos e controles não-regressivos

Não houve diferenças significantes na análise das médias totais das densidades microvasculares linfáticas considerando-se a mesma fase de crescimento tumoral entre melanomas regressivos e controles não-regressivos. Esses dados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Comparação das médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) considerando-se a mesma fase de crescimento entre melanomas extensivo-superficiais regressivos e controles não-regressivos

Fase de crescimento tumoral	Grupo	n	Média total das densidades microvasculares linfáticas do tumor (DMVL média) Média (Desvio padrão)	Valor p*
Radial	Regressivos	10	1.9×10^{-5} (6.6×10^{-6})	0.294
	Não-regressivos	8	2.3×10^{-5} (7.7×10^{-6})	
Vertical	Regressivos	6	2.4×10^{-5} (5.7×10^{-6})	0.553
	Não-regressivos	13	2.2×10^{-5} (8.3×10^{-6})	

* Teste t de Student para comparação de médias entre grupos independentes.

5.2.4 Comparação das médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) entre as fases radial e vertical de crescimento em cada grupo de melanomas (regressivos e não-regressivos)

As médias totais das densidades microvasculares linfáticas também não foram diferentes de modo significativo quando se analisou as diferentes fases de crescimento do tumor dentro de cada grupo de melanomas (regressivos e não-regressivos), individualmente. Esse dados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Comparação das médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) entre as fases radial e vertical de crescimento em cada grupo de melanomas extensivo- superficiais (regressivos e não- regressivos), individualmente

Grupo	Fase de crescimento tumoral	n	Média total das densidades microvasculares linfáticas do tumor (DMVL média) Média (Desvio padrão)	Valor p*
Regressivos	Radial	10	1.9×10^{-5} (6.6×10^{-6})	0.189
	Vertical	6	2.4×10^{-5} (5.7×10^{-6})	
Não-regressivos	Radial	8	2.3×10^{-5} (7.7×10^{-6})	0.695
	Vertical	13	2.2×10^{-5} (8.3×10^{-6})	

* Teste t de Student para comparação de médias entre grupos independentes.

5.2.5 Médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório intra e peritumoral em cada grupo de melanomas (regressivos e não-regressivos)

As médias totais das densidades microvasculares linfáticas nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório intra e peritumoral foram analisadas em cada grupo de melanomas (regressivos e não-regressivos). A pequena quantidade de casos não nos permitiu, porém, comparar. Esses dados são apresentados nos Anexos 5 e 6.

5.3 Média de tempo de seguimento, positividade do linfonodo sentinela e presença de metástases linfonodais e à distância dos pacientes estudados.

Embora não fosse o intuito do trabalho, como curiosidade, pudemos observar que a biópsia do linfonodo sentinela foi realizada em 4 dos 11 pacientes com melanomas regressivos (não nos foi possível obter esse dado nos melanomas regressivos restantes), sendo que todos se mostraram negativos. Não foi realizada tal técnica nos melanomas restantes por se tratar de casos mais antigos.

Um tempo médio de seguimento de aproximadamente 60 meses foi observado para 29 dos 37 pacientes estudados. Nesse período, nenhum desses pacientes apresentou metástase linfonodal ou sistêmica. Esses dados podem ser observados na Tabela 10 e Anexo 7.

Tabela 10. Média de tempo de seguimento, positividade do linfonodo sentinela e metástases linfonodais e à distância dos pacientes com melanomas extensivo-superficiais regressivos e não-regressivos

	Regressivos¹	Não regressivos²
Média do tempo de seguimento (meses)	63,64	62,83
	N (%)	N (%)
Linfonodo Sentinela³		
Positivo	0 (0.0)	
Negativo	4 (36.4)	
Não realizado	6 (54.5)	
Não encontrado	1 (9.1)	
Metástase linfonodal		
Ausente	11 (100.0)	18 (100.0)
Presente	0 (0.0)	0 (0.0)
Metástase à distância		
Ausente	11 (100.0)	18 (100.0)
Presente	0 (0.0)	0 (0.0)

¹ Informações de 11 casos; ² Informações de 18 casos; ³ Informações somente para os tumores regressivos.

6. DISCUSSÃO

Melanomas cutâneos são conhecidos por sua propensão à disseminação metastática através dos vasos linfáticos aos linfonodos regionais, mesmo nos estágios mais precoces da invasão tumoral (Detmar e Hirakawa, 2002). Metástase linfonodal é o maior determinante para o estadiamento e manejo clínico do melanoma (Balch et al., 2001). É ainda um desafio determinar o risco de desenvolvimento de metástases em pacientes com melanoma cutâneo primário. O prognóstico é normalmente baseado na espessura tumoral, mas um número considerável de pacientes com melanomas finos também desenvolve doença metastática. (Kalady et al., 2003). A biópsia do linfonodo sentinela é utilizada para detectar metástases nos pacientes com melanoma primário (Gershenwald et al., 1999). É difícil, entretanto, detectá-las através dessa técnica, já que são frequentemente microscópicas e requerem exame de múltiplos cortes. A dissecação do linfonodo sentinela pode, também, resultar em graus variados de linfedema (Wrone et al., 2000) ou morbidade sensorial (Temple et al., 2002). Novos indicadores preditivos de metástases se fazem, assim, necessários.

A presença de regressão em melanomas tem sido investigada por inúmeros autores, mas existem grandes discrepâncias na interpretação do seu significado prognóstico. As razões para esse fato não são claras, mas parecem estar relacionadas às diferentes definições de regressão usadas pelos vários autores. Esse pode ser um dos fatores responsáveis pela variação da incidência de regressão reportada, de 20% (Kelly et al., 1985) a 58% (Gromet et al., 1978), em diferentes

centros. A tendência mais recente parece ser restringir o termo regressão a uma forma estabelecida, que é aquela na qual as lesões mostram extensa perda das células de melanoma com substituição segmentar por fibrose. Um grupo considerável de autores concorda que a presença de extensa regressão cicatricial seja um sinal de mau prognóstico (Sondergaard e Hou- Jensen, 1985; Naruns et al., 1986; Ronan et al., 1987; Singluff et al., 1988; Blessing et al., 1990; Cook, 1992).

Optamos, assim, no presente estudo, por caracterizar histologicamente o fenômeno regressivo em fase precoce e tardia (modificado de McGovern, 1983), quantificando a extensão de cada uma delas através de análise semi-quantitativa. Muitas vezes, existia a concomitância de ambas em um mesmo caso. Do grupo de 37 melanomas estudados, 16 eram regressivos. Desses, 11 apresentavam regressão tardia, sendo 7 com extensão maior do que 50% e 4, até 25%.

Nestes casos, a intensidade do infiltrado inflamatório intra e peritumoral se mostrou maior nos melanomas regressivos comparados aos não-regressivos (Tabela 1). O significado do infiltrado inflamatório em melanoma parece variar, não somente de acordo com o tipo celular, mas também de acordo com a sua distribuição. Alguns autores advogam que o infiltrado linfocitário peritumoral esteja associado a bom prognóstico, mas a presença de plasmócitos no infiltrado parece ter o efeito inverso (Kopf et al., 1987).

Tefany e colaboradores, em 1991, encontraram um significativo aumento de células CD3 positivas infiltrando melanomas regressivos comparados aos não regressivos, aventando a hipótese de regressão em melanoma ser induzida por células T CD4 positivas ativadas.

Analizamos a fase de crescimento do tumor (radial ou vertical) em cada caso. Nos nossos achados, a fase de crescimento radial foi mais freqüente nos tumores regressivos (Tabela 1). Regressão é, de fato, um fenômeno muito mais comum nos melanomas em fase de crescimento radial (Kelly et al., 1985). Deve-se lembrar, entretanto, que, o melanoma fino regressivo pode mascarar uma fase vertical de crescimento que tenha sido destruída pelo processo regressivo.

A despeito da incerteza quanto ao significado prognóstico, regressão tem sido usada como componente das tabelas prognósticas da AFIP (Armed Forces Institute of Pathology) e proposta como indicador de propensão a metástases em melanomas finos (Guitart et al., 2002; Cook et al., 2002), fato que tem justificado a realização da biópsia do linfonodo sentinela (Kelly et al., 2001; Shaw et al., 1989; Gersenzwald et al., 1999).

Há, porém, autores, que consideram regressão um processo favorável, particularmente em melanomas finos, em decorrência de uma destruição das células tumorais pela reação imunológica. A seu ver, fase vertical de crescimento e mitoses seriam fatores preditivos mais importantes de metástases. Regressão, nesse caso, não deveria ser usada como critério para justificar a biópsia do linfonodo sentinela e características de regressão como extensão, estágio e espessura, não afetariam a correlação com o status do linfonodo sentinela. Crítica se faz à inclusão de melanomas espessos nesse estudo (Kaur et al., 2007).

Avanços científicos têm provido evidências de que tumores malignos podem promover linfangiogênese e metástases linfáticas diretamente (Detmar e Hirakawa, 2002). Portanto, a compreensão dos eventos moleculares na linfangiogênese induzida pelo tumor talvez elucide os mecanismos de metástases

tumorais, fornecendo, assim, novos indicadores prognósticos para o risco de metástases em melanoma e novos avanços terapêuticos.

Estudos sobre o sistema linfático têm sido prejudicados pela falta de marcadores linfáticos específicos. Assim sendo, nosso conhecimento do sistema linfático nos processos fisiológicos e patológicos permanece limitado. A recente identificação de genes que controlam especificamente o desenvolvimento linfático durante a embriogênese e a linfangiogênese patológica, juntamente com a descoberta dos novos marcadores específicos para endotélio linfático, tem provido novos avanços no conhecimento dos mecanismos moleculares que regulam o desenvolvimento e função dos linfáticos. (Oliver e Detmar, 2002; Alitalo e Carmeliet, 2002).

Dentre esses marcadores, um dos mais importantes é o anticorpo monoclonal anti-D2-40, que reconhece especificamente a podoplanina humana, uma glicoproteína do tipo mucina, que é expressa pelo endotélio linfático (Fukunaga, 2005). O D2-40 é um marcador altamente sensível e específico de endotélio linfático em tecidos normais e num grupo de lesões vasculares, incluindo sarcoma de Kaposi, tumor de Dabska e linfangioma. Esse anticorpo também tem o potencial para aumentar a acurácia na detecção de invasão linfática nos tumores primários (Fukunaga, 2005; Kahn e Marks, 2002; Kahn et al., 2002; Niakosari et al., 2005).

Até o momento, não foram realizados estudos quantificando densidade microvascular linfática em melanomas regressivos, fato que motivou este trabalho, em que se analisou a densidade microvascular linfática média, comparando melanomas regressivos e não regressivos, áreas regressivas e não-regressivas e de regressão precoce e tardia de um mesmo tumor. Ao final do estudo, demonstrou-se

maior densidade microvascular linfática na fase tardia da regressão comparada à área do mesmo tumor regressivo que não mostrava regressão (controle interno) (Tabela 7).

Esses achados podem sugerir que regressão espontânea em melanoma, na sua fase tardia, esteja associada a um pior prognóstico, já que apresenta uma maior densidade microvascular linfática média e esse dado, estudado em melanomas não regressivos, é relacionado, na literatura, a uma maior chance de disseminação metastática (Dadras, 2005).

Se confirmados os nossos dados com maior casuística, talvez a indicação da biópsia do linfonodo sentinela nos melanomas finos regressivos possa ser restrita aos que apresentem regressão na sua fase tardia.

Quando comparamos a densidade microvascular linfática média entre a mesma fase de crescimento (radial e vertical) em melanomas regressivos e não-regressivos e entre as diferentes fases de crescimento no mesmo grupo de tumores, individualmente, não foram encontradas diferenças (Tabelas 8 e 9).

Estudamos, ainda a densidade microvascular linfática média nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório intra e peritumoral em cada grupo de tumores. O pequeno número de casos não nos permitiu fazer tal comparação (Anexos 5 e 6).

A despeito dos avanços recentes no conhecimento do controle molecular do crescimento e desenvolvimento tumoral, nosso conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no processo de metástase tumoral permanecem rudimentares. Estudos do desenvolvimento normal e do crescimento patológico do sistema vascular sanguíneo

têm elucidado muitos dos mecanismos moleculares que controlam a angiogênese da vasculatura sanguínea. (Galé e Yancopoulos,1999).

O suprimento de oxigênio e nutrientes necessários para o crescimento das células tumorais é obtido através da formação de novos vasos sanguíneos. Angiogênese não é somente necessária ao crescimento tumoral, mas também às metástases. No intuito de adquirir uma vasculatura funcional, as células tumorais produzem um grande número de fatores angiogênicos. Existem inúmeros fatores de crescimento e citocinas que estimulam ou inibem o processo de angiogênese (Rak et al.,1996).

O significado prognóstico da angiogênese no melanoma é controverso. Estimulados pela teoria da importância da angiogênese em metástases em câncer, inúmeros estudos têm indicado que o número e a densidade de microvasos em tumores sólidos, como carcinomas de mama (Weidner et al.,1991; Weidner et al., 1992), pulmão (Macchiarini et al., 1992) e próstata se correlacionam com potencial de invasão e metástase.

Estudos preliminares sugerem que pode haver uma relação entre a extensão da vascularização tumoral e a incidência de metástases em melanoma cutâneo. (Srivastava et al., 1988; Graham et al., 1994).

Srivastava e colaboradores (1988) relataram que vascularização aumentada na base do tumor, medida pelo percentual de área de vasos, pode ter significância prognóstica em melanomas de espessura intermediária (0,76 a 4,0 mm). Graham e colaboradores (1994), usando um anticorpo contra o antígeno fator VIII-relacionado,mostraram que alta densidade microvascular era um importante indicador prognóstico de metástases e/ou morte em melanomas finos(< 0,76). Porém,

devido ao pequeno número de pacientes na maioria desses estudos, o significado da vascularização em melanoma permanece incerto.

Estudos semelhantes de Neitzel e colaboradores (1999) e Rongioletti e colaboradores (1996) também enfatizaram a importância da vascularização em metástases.

Demirkesen e colaboradores, em 2006, usando o CD31, encontraram uma maior densidade microvascular em melanomas com presença simultânea de metástases. Também encontraram correlação entre a expressão de VEGF e bFGF e a progressão em melanoma, além de correlação de expressão de VEGF e bFGF com densidade microvascular. Sugeriram que os linfócitos peritumorais alteram o comportamento biológico do tumor, afetando a angiogênese, uma vez que notaram expressão aumentada de VEGF nos linfócitos da periferia do tumor.

Em contrapartida, Carnochan e colaboradores (1991) e Busam e colaboradores (1995), esse último usando o *Ulex europaeus agglutinin I* como marcador, não encontraram correlação entre angiogênese e recorrência ou metástases em melanomas.

Tentamos, então, correlacionar densidade microvascular à regressão em melanoma.

A capacidade de adesão das células endoteliais tem importância crucial na angiogênese (Horak et al., 1992). A molécula de adesão de trombócito/célula endotelial PECAM-1, também conhecida como anticorpo CD31, é usada na avaliação da neovascularização em várias pesquisas em câncer. O CD31 é considerado o melhor marcador para endotélio vascular e marca, ocasionalmente, endotélio linfático (Coindre JM, 2003; Miettinen et al., 1994). Por esse motivo, foi

escolhido, neste trabalho, para a quantificação da densidade microvascular panvascular ou geral (DMVG), que não se mostrou diferente quando comparamos melanomas regressivos e não regressivos, área regressiva e não regressiva ou áreas de regressão precoce e tardia do mesmo tumor .

Esse nosso achado é, de certo modo, coerente, já que metástase hematogênica em melanomas finos é, realmente, mais rara.

Nossos resultados são conflitantes com os de Barnhill e Levi (1993), que utilizando o *Ulex europaeus agglutinin I*, encontraram melanomas cutâneos regressivos microinvasivos apresentando densidade microvascular substancialmente maior do que os não-regressivos de espessura similar.

Acreditamos que as discrepâncias entre os estudos podem ser devidas à aplicação de diferentes métodos para a morfometria da neovascularização e ao uso de diferentes marcadores.

Antes dos estudos de Barnhill e colaboradores (1992) e Barnhill e Levi (1993), vários autores haviam mencionado a vascularização proeminente nas áreas de regressão em melanomas cutâneos (McGovern, 1983; Gromet et al., 1978; Clark et al., 1989; Weidner et al., 1991; Srivastava et al., 1988), porém nenhum deles correlacionou o aumento da vascularização com metástases em melanomas cutâneos regressivos.

Analisamos a densidade microvascular geral entre a mesma fase de crescimento nos dois grupos de melanomas (regressivos e não-regressivos) e também entre as diferentes fases de crescimento em cada grupo de tumores, individualmente. Não encontramos diferenças. Os resultados podem ser vistos nas Tabelas 4 e 5.

Estudamos, ainda, a densidade microvascular geral nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório intra e peritumoral em cada grupo de tumores. O pequeno número de casos não nos permitiu fazer comparação (Anexos 3 e 4).

Com relação aos dados disponíveis relativos à avaliação do linfonodo sentinela, que não foi o objetivo do nosso trabalho, constatou-se que foi realizada em apenas 4 pacientes e todos se mostraram negativos (Tabela 10 e Anexo 7). Tal avaliação não foi realizada nos outros 6 casos de melanomas regressivos, já que eram casos mais antigos. Curiosamente, os 4 melanomas com linfonodo sentinela negativo, apresentavam fase de regressão tardia com extensão acima de 50%. Esses pacientes, porém, individualmente, ainda não apresentam seguimento de 5 anos. Além disso, o número de casos é pequeno para qualquer conclusão.

No seguimento de, em média, 5 anos dos nossos doentes (29 dos 37 estudados), não encontramos nenhum que apresentasse metástase linfonodal ou à distância, mesmo naqueles casos com regressão tardia (Anexo 7).

Embora tenhamos estudado um pequeno número de casos, esses últimos dados falam contra a hipótese de possível pior prognóstico dos melanomas com regressão tardia. Isso nos faz pensar nas controvérsias existentes quanto à correlação de densidade microvascular linfática e metástases linfonodais ou ainda, nas diferenças metodológicas utilizadas nos diversos trabalhos.

Em conclusão, encontramos, nesse trabalho uma maior densidade microvascular linfática na área de regressão tardia quando comparada à área sem regressão do mesmo tumor. Isso, a princípio, nos faz supor que talvez regressão tardia seja sinal de mau prognóstico e que somente melanomas regressivos que se apresentem nesse estágio devam ser submetidos à biópsia do linfonodo sentinela.

O nosso acompanhamento médio de 5 anos dos casos, porém, nos faz questionar o pior prognóstico do fenômeno regressivo a longo prazo, o que vai de encontro a muitas opiniões na literatura. Além disso, no que tange à angiogênese, não conseguimos correlacionar esse dado ao fenômeno regressivo em melanoma. Se, no futuro, aumentarmos a nossa casuística e avaliarmos outros parâmetros importantes como área e perímetro dos vasos, fatores indutores de linfo e angiogênese, citocinas, invasão vascular, índice de proliferação de células endoteliais, em melanomas regressivos, talvez possamos dar mais alguns passos na direção da elucidação do prognóstico do fenômeno regressivo.

7. CONCLUSÕES

1. Quando se comparou melanomas extensivo- superficiais finos (índice de Breslow $\leq 1\text{mm}$) regressivos e não regressivos, as médias totais das densidades microvasculares linfática e panvascular do tumor não se mostraram diferentes.
2. A média da densidade microvascular linfática na área de regressão tardia se mostrou maior quando comparada à área não regressiva do mesmo tumor, enquanto que o mesmo não ocorreu com a média da densidade microvascular panvascular;
3. Não foram encontradas diferenças entre as médias das densidades microvasculares linfática e panvascular na área de regressão precoce e tardia, tampouco entre a área de regressão precoce e a área não-regressiva do mesmo tumor.
4. As médias totais das densidades microvasculares linfática e panvascular não se apresentaram diferentes considerando-se a mesma fase de crescimento tumoral entre melanomas regressivos e não-regressivos;
5. As médias totais das densidades microvasculares linfática e panvascular não se mostraram diferentes quando se analisou as diferentes fases de crescimento tumoral (radial e vertical) dentro de cada grupo de melanomas regressivos e não regressivos, individualmente.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Melanomas extensivo-superficiais regressivos e não- regressivos: Características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas

Idnum	SEXO	COR	IDADE	LOCAL	BRESLOW (mm)	CLARK	FASECRES	RPRECOCE	RTARDIA	INFINTRA	INFPERIT	GRUPO
1	M	Branco	67	Membro sup	0,2	II	Radial	3	0	1	2	Regressivos
2	F	Branco	41	Tronco	0,6	II	Radial	3	3	1	2	Regressivos
3	M	Branco	77	Tronco	0,4	III	Vertical	0	0	0	2	Não-regressivos
4	F	Branco	36	Tronco	0,5	III	Vertical	0	0	0	1	Não-regressivos
5	F	Branco	75	Tronco	0,7	III	Radial	3	1	1	3	Regressivos
6	F	Branco	78	Membro inf	0,45	II	Radial	0	0	0	1	Não-regressivos
7	M	Branco	70	Tronco	0,6	II	Radial	0	3	1	2	Regressivos
8	F	Branco	70	Tronco	0,2	II	Radial	3	3	1	3	Regressivos
9	M	Branco	74	Membro sup	0,4	III	Radial	3	0	2	3	Regressivos
10	F	Branco	64	Membro inf	0,3	II	Radial	0	0	0	1	Não-regressivos
11	M	Branco	58	Membro inf	0,6	III	Vertical	0	0	0	2	Não-regressivos
12	M	Branco	53	Membro inf	1	III	Vertical	3	3	1	3	Regressivos
13	M	Branco	79	Cabeça	0,5	III	Vertical	0	0	1	2	Não-regressivos
14	F	Branco	61	Membro inf	0,2	II	Vertical	1	3	1	3	Regressivos
15	M	Branco	33	Tronco	1	III	Vertical	3	1	1	3	Regressivos
16	F	Branco	76	Cabeça	0,3	II	Radial	1	0	0	2	Regressivos
17	M	Branco	56	Membro sup	0,85	IV	Vertical	3	3	0	1	Regressivos
18	M	Branco	54	Tronco	0,5	II	Radial	0	0	0	1	Não-regressivos
19	F	Branco	79	Membro sup	0,3	III	Vertical	0	0	0	2	Não-regressivos
20	M	Branco	78	Cabeça	1	III	Vertical	0	0	0	1	Não-regressivos
21	F	Branco	70	Membro inf	0,4	II	Radial	2	0	0	1	Regressivos
22	F	Pardo	53	Membro inf	0,4	II	Radial	3	1	1	3	Regressivos

Continua...

Conclusão Anexo 1

Idnum	SEXO	COR	IDADE	LOCAL	BRESLOW (mm)	CLARK	FASECRES	RPRECOCE	RTARDIA	INFINTRA	INFPERIT	GRUPO
23	F	Branco	72	Tronco	0,13	II	Radial	2	0	1	2	Regressivos
24	M	Branco	47	Pescoço	0,25	II	Radial	0	0	0	2	Não-regressivos
25	F	Branco	53	Membro inf	0,3	II	Radial	0	0	0	1	Não-regressivos
26	F	Branco	38	Membro inf	0,5	III	Vertical	0	0	1	2	Não-regressivos
27	M	Branco	83	Membro sup	0,9	IV	Vertical	0	0	0	1	Não-regressivos
28	F	Branco	58	Tronco	0,69	IV	Vertical	0	1	1	3	Regressivos
29	F	Branco	58	Membro sup	0,5	III	Vertical	0	0	1	3	Não-regressivos
30	M	Branco	66	Tronco	0,8	III	Vertical	0	0	0	2	Não-regressivos
31	M	Branco	50	Membro inf	0,5	III	Vertical	0	0	1	2	Não-regressivos
32	F	Branco	45	Membro sup	0,9	III	Vertical	0	0	0	1	Não-regressivos
33	M	Branco	84	Tronco	0,55	III	Vertical	0	0	0	1	Não-regressivos
34	M	Branco	26	Membro sup	0,4	II	Radial	0	0	1	2	Não-regressivos
35	F	Branco	61	Tronco	0,25	II	Radial	0	0	0	2	Não-regressivos
36	M	Branco	52	Membro inf	0,5	III	Vertical	3	3	1	2	Regressivos
37	M	Branco	63	Pescoço	0,25	II	Radial	0	0	1	2	Não-regressivos

Id num: número de identificação; Breslow: índice de espessura de Breslow; Clark: nível de invasão de Clark

Fasecres: fase de crescimento tumoral; Rprecoc: regressão precoce (0:ausente; 1: presente +; 2: presente ++; 3: presente +++); Rtardia: regressão tardia (0:ausente; 1: presente +; 2: presente ++; 3: presente +++); Infintra: infiltrado inflamatório intratumoral (0:ausente 1:leve 2:moderado); Infperit: infiltrado inflamatório peritumoral (1:leve 2:moderado 3: acentuado); Membro sup: membro superior; Membro inf: membro inferior; M: masculino

F: feminino

Anexo 2 - Médias totais das densidades microvasculares linfáticas e gerais utilizadas nas comparações realizadas entre os melanomas extensivo- superficiais regressivos e não- regressivos, e densidades microvasculares linfáticas e gerais médias das áreas regressivas e não-regressivas de um mesmo melanoma regressivo utilizadas nas comparações realizadas neste estudo

Idnum	média_dmv _rp_D240	média_dmv _rt_D240	média_dmv _tci_D240	média_total_ dmvl_D240	CD31_VAL (0=não CD31; 1=CD31)	média_dmv _p_cd31	média_dmv _rt_cd31	média_dmv _tci_cd31	média_dmv _total_cd31
1			1,81599E-05	1,81599E-05	1	3,59558E-05			3,59558E-05
2	1,25889E-05	2,15059E-05	1,51229E-05	1,80388E-05	1	6,11205E-05	0,000172528		0,000163461
3			1,84886E-05	1,84886E-05	0				
4			1,33276E-05	1,33276E-05	1			8,08953E-05	8,08953E-05
5			1,69328E-05	1,69328E-05	1			0,00049305	0,00049305
6			1,24466E-05	1,24466E-05	1			0,000195609	0,000195609
7	1,70956E-05	2,80879E-05	3,17181E-05	2,8569E-05	1	0,000117043	9,47979E-05	0,000112171	0,000112009
8	1,87664E-05	1,87573E-05	1,45588E-05	1,68707E-05	1	7,31092E-05	7,57589E-05	0,000105295	7,9527E-05
9		8,38122E-06	1,27642E-05	1,00248E-05	0				
10			3,00521E-05	3,00521E-05	1			0,000108486	0,000108486
11			3,02052E-05	3,02052E-05	1			5,81407E-05	5,81407E-05
12	4,19478E-05	2,69938E-05	1,66328E-05	2,46897E-05	1	7,76442E-05	0,00016192		0,000107743
13			2,01893E-05	2,01893E-05	0				
14	2,64986E-05	3,01505E-05	2,83203E-05	2,83906E-05	1	5,74973E-05	0,000140207	8,35012E-05	9,37352E-05
15	2,34327E-05	4,38198E-05	3,08367E-05	3,16762E-05	1	9,04782E-05	0,000154984	7,97323E-05	0,000106822
16			1,74165E-05	1,74165E-05	1		0,000131276	6,46785E-05	8,13279E-05
17	2,01091E-05	2,02825E-05	1,40288E-05	1,81401E-05	1	7,51097E-05	0,000176367	9,65824E-05	0,000124736
18			2,97462E-05	2,97462E-05	1			0,000130748	0,000130748
19			1,99165E-05	1,99165E-05	1			0,000150651	0,000150651

Continua...

Conclusão Anexo 2

Idnum	média_dmv_l _rp_D240	média_dmv_l _rt_D240	média_dmv_l _tci_D240	média_total_ dmvl_D240	CD31_VAL (0=não CD31; 1=CD31)	média_dmv_g_r p_cd31	média_dmv_g_rt_ cd31	média_dmv_g_tci _cd31	média_dmv_g_total _cd31
20			4,40804E-05	4,40804E-05	1			0,00010122	0,00010122
21			1,24594E-05	1,24594E-05	0				
22	3,00341E-05		3,22549E-05	3,09859E-05	1	0,00011554		6,98503E-05	9,2695E-05
23	1,44059E-05	3,25858E-05	2,42051E-05	2,38714E-05	0				
24			1,95303E-05	1,95303E-05	1			7,80893E-05	7,80893E-05
25			2,1109E-05	2,1109E-05	0				
26			2,23492E-05	2,23492E-05	0				
27			2,55795E-05	2,55795E-05	1			6,8793E-05	6,8793E-05
28		4,07778E-05	1,49431E-05	2,28922E-05	1	0,000213937	0,000146549	0,000145382	0,00015417
29			1,85149E-05	1,85149E-05	1			4,6279E-05	4,6279E-05
30			1,74649E-05	1,74649E-05	1			0,000119073	0,000119073
31			1,52181E-05	1,52181E-05	1			0,00023906	0,00023906
32			2,2142E-05	2,2142E-05	1			0,000156052	0,000156052
33			1,25086E-05	1,25086E-05	1			4,91766E-05	4,91766E-05
34			1,92823E-05	1,92823E-05	1			4,03169E-05	4,03169E-05
35			3,48028E-05	3,48028E-05	0				
36	8,12765E-06	1,87731E-05	1,6292E-05	1,71286E-05	1	0,00010255	8,99339E-05	7,74709E-05	6,77008E-05
37			1,69043E-05	1,69043E-05	1			8,90476E-05	8,90476E-05

idnum: Número de identificação; dmvl :densidade microvascular linfática; dmvg:densidade microvascular geral; rp: regressão precoce; rt: regressão tardia;tci: área do tumor regressivo que não apresentava regressão (controle interno); CD31:0-não foi realizado;CD31:1-foi realizado; E: 10⁻

Anexo 3 - Médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório intratumoral em cada grupo de melanomas extensivo- superficiais (regressivos e não regressivos).

Grupo	Intensidade do infiltrado	n	Média total das densidades microvasculares gerais do tumor (DMVG média) Média (Desvio padrão)
Regressivos	Ausente	2	10.3×10^{-5} (3.1×10^{-5})
	Leve	11	13.7×10^{-5} (12.3×10^{-5})
Não-regressivos	Ausente	12	10.8×10^{-5} (4.4×10^{-5})
	Leve	4	10.4×10^{-5} (9.3×10^{-5})

Anexo 4 - Médias totais das densidades microvasculares gerais (DMVG) nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório peritumoral em cada grupo de melanomas extensivo-superficiais (regressivos e não- regressivos).

Grupo	Intensidade do infiltrado	n	Média total das densidades microvasculares gerais do tumor (DMV média) Média (Desvio padrão)
Regressivos	Leve	1	12.5×10^{-5}
	Moderado	5	9.2×10^{-5} (4.8×10^{-5})
	Acentuado	7	16.1×10^{-5} (14.8×10^{-5})
Não-regressivos	Leve	8	11.1×10^{-5} (4.8×10^{-5})
	Moderado	7	11.1×10^{-5} (6.8×10^{-5})
	Acentuado	1	4.6×10^{-5}

Anexo 5 - Médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório intratumoral em cada grupo de melanomas extensivo- superficiais (regressivos e não-regressivos)

Grupo	Intensidade do infiltrado	n	Média total das densidades microvasculares linfáticas do tumor (DMVL média) Média (Desvio padrão)
Regressivos	Ausente	3	1.6×10^{-5} (3.1×10^{-6})
	Leve	12	2.3×10^{-5} (5.7×10^{-6})
	Moderado	1	1.0×10^{-5}
Não-regressivos	Ausente	15	2.3×10^{-5} (9.0×10^{-6})
	Leve	6	1.9×10^{-5} (2.5×10^{-6})

Anexo 6 - Médias totais das densidades microvasculares linfáticas (DMVL) nas diferentes intensidades de infiltrado inflamatório peritumoral em cada grupo de melanomas extensivo- superficiais (regressivos e não-regressivos)

Grupo	Intensidade do infiltrado	n	Média total das densidades microvasculares linfáticas do tumor (DMVL média) Média (Desvio padrão)
Regressivos	Leve	2	1.5×10^{-5} (4.0×10^{-6})
	Moderado	6	2.1×10^{-5} (4.7×10^{-6})
	Acentuado	8	2.3×10^{-5} (7.7×10^{-6})
Não regressivos	Leve	9	2.3×10^{-5} (10.4×10^{-6})
	Moderado	11	2.1×10^{-5} (5.9×10^{-6})
	Acentuado	1	1.9×10^{-5}

Anexo 7 - Tempo de seguimento , positividade do linfonodo sentinela e presença de metástases linfonodais e à distância nos pacientes com melanomas extensivo-superficiais regressivos e não-regressivos

IDNUM	SEXO	IDADE	GRUPO	LINFONODO SENTINELA	TEMPO DE SEGUIMENTO (meses)	METÁSTASE LINFONODAL	METÁSTASE À DISTÂNCIA
1	M	67	Regressivos	NR	48	Ausente	Ausente
2	F	41	Regressivos	NR	120	Ausente	Ausente
3	M	77	Não-regressivos		53	Ausente	Ausente
4	F	36	Não-regressivos		164	Ausente	Ausente
5	F	75	Regressivos	NR	14	Ausente	Ausente
6	F	78	Não-regressivos		192	Ausente	Ausente
7	M	70	Regressivos				
8	F	70	Regressivos	Negativo	48	Ausente	Ausente
9	M	74	Regressivos				
10	F	64	Não-regressivos				
11	M	58	Não-regressivos		61	Ausente	Ausente
12	M	53	Regressivos	Negativo	24	Ausente	Ausente
13	M	79	Não-regressivos		51	Ausente	Ausente
14	F	61	Regressivos				
15	M	33	Regressivos				
16	F	76	Regressivos				
17	M	56	Regressivos	Negativo	21	Ausente	Ausente
18	M	54	Não-regressivos		65	Ausente	Ausente
19	F	79	Não-regressivos		53	Ausente	Ausente
20	M	78	Não-regressivos				
21	F	70	Regressivos	NR	127	Ausente	Ausente
22	F	53	Regressivos	Não encontrado	86	Ausente	Ausente
23	F	72	Regressivos	NR	69	Ausente	Ausente
24	M	47	Não-regressivos		40	Ausente	Ausente
25	F	53	Não-regressivos		52	Ausente	Ausente
26	F	38	Não-regressivos				
27	M	83	Não-regressivos		102	Ausente	Ausente
28	F	58	Regressivos	NR	119	Ausente	Ausente
29	F	58	Não-regressivos		66	Ausente	Ausente
30	M	66	Não-regressivos		37	Ausente	Ausente
31	M	50	Não-regressivos		5	Ausente	Ausente
32	F	45	Não-regressivos		59	Ausente	Ausente
33	M	84	Não-regressivos		46	Ausente	Ausente
34	M	26	Não-regressivos		15	Ausente	Ausente
35	F	61	Não-regressivos		54	Ausente	Ausente
36	M	52	Regressivos	Negativo	24	Ausente	Ausente
37	M	63	Não-regressivos		16	Ausente	Ausente

Id num: número de identificação; M: masculino; F: feminino; NR: Não realizado

9. REFERÊNCIAS

Abramova L, Slingluff CL Jr., Patterson JW. Problems in the interpretation of apparent “radial growth phase” malignant melanomas that metastasize. *J Cutan Pathol* 2002;29:407-14.

Achen MG, Williams RA, Minekus MP, Thornton GE, Stenvers K, Rogers PA, Lederman F, Roufail S, Stacker SA. Localization of vascular endothelial growth factor- D in malignant melanoma suggests a role in tumour angiogenesis. *J Pathol.* 2001;193:147-54.

American Melanoma Foundation. *Facts about melanoma* [Acessado em 18/11/2007]. Disponível em: <http://www.melanomafoundation.org/facts/statistics.htm>.

Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell.* 2002;1:219-27.

Balch CM, Houghton AN. Metastatic melanoma from an unknown primary site. In: Balch MC, Houghton AN, Milton WG, Sober AJ, Soong SJ, editors. *Cutaneous Melanoma*. 2nd ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1992. p.466-7.

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001;19:3635-48.

Barnhill RL, Mihm MC Jr, Ceballos PI. Angiogenesis and regressing cutaneous malignant melanoma. *Lancet* 1992; 339: 991-2.

Barnhill RL, Fandrey K, Levy MA, Mihm Jr MC, Hyman B. Angiogenesis and tumor progression of melanoma. Quantification of vascularity in melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma. *Lab Invest*. 1992;67:331-7.

Barnhill RL, Mihm MC Jr. The histopathology of cutaneous malignant melanoma. *Semin Diagn Pathol*. 1993;10:47-75.

Barnhill RL, Levy MA. Regressing thin cutaneous malignant melanomas ($\leq 1,0$ mm) are associated with angiogenesis. *Am J Pathol*. 1993;143:99-104.

Barnhill RL, Piepkorn M, Busam KJ. Pathology of melanocytic nevi and malignant melanoma. 2nd ed. New York: Springer; 2004. p.238-394.

Bayer-Gardner IB, Ivan D, Schwartz MR, Tschien JA. The immunopathology of regression in benign lichenoid keratosis, keratoacanthoma and halo nevus. *Clin Med Res*. 2004; 2;89-97.

Bennet,WH. Some peculiarities in the behaviour of certain malignant and innocent growths. *Lancet*. 1899; jan:3-4.

Bernsen MR, Diepstra JHS, Mil PV, Punt CJA, Figdor CG, Muijen GNP, Adema GJ, Ruiter DJ. Presence and location of T-cell subsets in relation to melanocyte differentiation antigen expression and tumour regression as assessed by immunohistochemistry and molecular analysis of microdissected T cells. *J Pathol*. 2004; 202:70-9.

Blessing K, McLaren KM, McLean A, Davidson P. Thin malignant melanomas (less than 1,5 mm) with metastasis: a histological study and survival analysis. *Histopathology*. 1990;17:389-95.

Boyle P, Maisonneuve P, Dore JF. Epidemiology of malignant melanoma. *Br Med Bull*. 1995; 51:523-47.

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970;172:902-8.

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

Busam KJ, Berwick M, Blessing K, Fandrey K, Kang S, Karaoli T, Fine J, Cochran AJ, White WL, Rivers J. Tumor vascularity is not a prognostic factor for malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol.* 1995;147:1049-56.

Carnochan P, Briggs JC, Westburry G, Davies AJ. The vascularity of cutaneous melanoma: a quantitative histological study of lesions 0,85 -1,25 mm in thickness. *Br J Cancer.* 1991;64:102-7.

Cascinelli N, Zurrida S, Galimberti V, Bartoli C, Bufalino R, Del Prato I, Mascheroni L, Testori A, Clemente C. *Acral lentiginous* melanoma: a histological type without prognostic significance. *J Dermatol Surg Oncol.* 1994;20:817-22.

Ceballos PI, Barnhill RL. Spontaneous regression of cutaneous tumors. *Adv Dermatol.* 1993;8:229-262.

Chen YJ, Wu CY, Chen JT, Shen JL, Chen CC, Wang HC. Clinicopathological analysis of malignant melanoma in Taiwan. *J Am Acad Dermatol.* 1999;41: 945-9.

Clark WH. Tumor progression and the nature of cancer. *Br J Cancer.* 1991;64:631-644.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst.* 1989;81:1893-904.

Clark WH Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969;29:705-27.

Coindre JM. Immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue tumours. *Histopathology.* 2003;43:1-16.

Cook MG, Spatz A, Brocker EB, Ruiter DJ. Identification of histological features associated with metastatic potential in thin (<1,0 mm) cutaneous melanoma with metastases. A study on behalf of EORTC melanoma group. *J Pathol.* 2002;197:188-93.

Cook MG. The significance of inflammation and regression in melanoma. *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992;420:113-5.

Cooper PH, Wanebo HJ, Hagar W. Regression in thin malignant melanoma. Microscopic diagnosis and prognostic importance. *Arch Dermatol.* 1985;121:1127-31.

Cox NH, Aitchison TC, Sirel JM, Mackie RM, Scottish Melanoma Group. Comparison between lentigo maligna melanoma and other histogenetic types of malignant melanoma of the head and neck. *Br J Cancer.* 1996; 73:940-4.

Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. *The melanocytic proliferations: a comprehensive textbook of pigmented lesions.* New York : Wiley-Liss; 2001. p.539.

Cui J, Chen D, Misfeldt ML, Swinfard RW, Bystryn JC. Antimelanoma antibodies in swine with spontaneously regressing melanoma. *Pigment Cell Res.* 1995;8:60-3.

Czarnetzki BM, Denter M, Brocker EB, Rümke P, Krieg V, Vakilzadeh F, Macher E. Clinical features of superficial spreading melanomas with zones of regression. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1984;107:225-8.

Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, Ellwanger U, Garbe C, Mihm MC, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol.* 2003;162:1951-60.

Dadras SS, Detmar M. Angiogenesis and lymphangiogenesis of skin cancers. *Hematol Oncol Clin N Am.* 2004;18:1059-70.

Dadras SS, Asschenfeldt BL, Velasco P, Nguyen L, Vora A, Muzikansky A, Jehnke K, Hauschild A, Hirakawa S, Mihm MC, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol.* 2005;18:1-11.

Das Gupta R, Bowden L, Berg JW. Malignant melanoma of unknown primary origin. *Surg Gynecol Obstet.* 1963;117:341-5.

Demirkesen C, Buyukpinarbasili N, Ramazanoglu R, Oguz O, Mandel NM, Kaner G. The correlation of angiogenesis with metastasis in primary cutaneous melanoma: a comparative analysis of microvessel density, expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor. *Patlology.* 2006; 38:132-7.

Depasquale I, Thompson WD. Microvessel density for melanoma prognosis. *Histopathology.* 2005;47:186-194.

Detmar M, Hirakawa S. The formation of lymphatic vessels and its importance in the setting of malignancy. *J Exp Med.* 2002;6:713-8.

Elston DM . Mechanisms of regression. *Clin Med Res.* 2004; 2:85-8.

Erhard H, Rietveld FJ, van Altena MC, Bröcker EB, Ruiter DJ, de Waal RM. Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Melanoma Res.* 1997;7:19-26.

Everson TC, Cole WH. *Spontaneous regression of cancer*. Philadelphia: WB Saunders; 1966. p.164-220.

Flotte TJ, Mihm MC Jr. Lentigo maligna and malignant melanoma in situ, lentigo maligna type. *Hum Pathol*. 1999;30:533-6.

Fontaine D, Parkhill W, Greer W, Walsh N. Partial regression of primary cutaneous melanoma: is there an association with sub-clinical sentinel lymph node metastasis? *Am J Dermatopathol*. 2003; 25: 371-3.

Fukunaga M. Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours. *Histopathology*. 2005;46:396-402.

Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases:VEGFs, angiopoietins and ephrins in vascular development.*Genes Dev*.1999;13:1055-66.

Gershenwald JE, Thompson W, Mansfield PF, Le JE, Colome MI, Tseng CH, Lee JJ, Balch CM, Reintgen DS, Ross MI. Multi institucional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. *J Clin Oncol*.1999;17:976-83.

Graham CH, Rivers J, Kerbel RS, Stamkiewicz KS, White WL. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (< 0,76) malignant melanomas. *Am J Pathol*. 1994;145:510-4.

Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 2007; 445:851-7.

Gromet MA, Epstein WL, Blois MS. The regressing thin malignant melanoma: a distinctive lesion with metastatic potential. *Cancer*.1978;42:2282-92.

Guitart J, Lowe L, Piepcorn M, Prieto VG, Rabkin MS, Ronan SG, Shea CR, Tron VA, White W, Barnhill RL. Histological characteristics of metastasizing thin melanomas: a case control study of 43 cases. *Arch Dermatol.*2002;138:603-8.

He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:819-25.

Heenan PJ, Matz LR, Blackwell JB, Kelsall GR, Singh A, ten Seldam RE, Holman CD. Inter-observer variation between pathologists in the classification of cutaneous melanoma in western Australia. *Histopathology.*1984; 8:717-29.

High WA, Stewart D, Wilbers CRH, Cockerell CJ, Hoang MP, Fitzpatrick JE. Completely regressed primary cutaneous malignant melanoma with nodal and/or visceral metastases: a report of 5 cases and assesment of the literature and diagnostic criteria. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53:89-100.

Hillen F, van de Winkel A, Creytens D, Vermeulen A H M, Griffioen A W. Proliferating endothelial cells, but not microvessel density, are a prognostic parameter in human cutaneous melanoma. *Melanoma Res.*2006;16:453-7.

Hiyama E, Hiyama K, Nishiyama M, Reynolds CP, Shay JW, Yokoyama T. Differential gene expression profiles between neuroblastomas with high telomerase activity and low telomerase activity. *J Pediatr Surg.* 2003;38:1730-4.

Holt JB, Sanguenza OP, Levine EA, Shen P, Bergman S, Geisinger KR, Criager AJ. Nodal melanocytic nevi in sentinel lymph nodes. *Am J Clin Pathol.* 2004;121:58-63.

Horak FR, Leek R, Klenk N, Le Jeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniwske K, Harris AL. Angiogenesis assessed by platelet/ endothelial cell adhesion molecule antibodies, as an indicator of node metastasis and survival in breast cancer. *Lancet.* 1992;340:1120-4.

Hubler Jr WR, Wolf Jr JE. Melanoma. Tumor angiogenesis and human neoplasia. *Cancer* 1976;38:187-92.

Instituto Nacional do Câncer — INCA. Câncer de Pele — Melanoma. [Acessado em 17/06/2008]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335.

Jain RK, Carmeliet PF. Vessels of death or life. *Sci Am*. 2001;285:38-45.

Kalady MF, White RR, Johnson JL, Tyler DS, Seigler HF. Thin melanomas: predictive lethal characteristics from a 30-year clinical experience. *Ann Surg*. 2003;238:528-37.

Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CMM, Nosrati M, Miler JR. Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2002;20:1826-31.

Kato T, Suetake T, Sugiyama Y, Tabata N, Tagami H. Epidemiology and prognosis of subungueal melanoma in 34 Japanese patients. *Br J Dermatol*. 1996;134:383-7.

Kaur C, Thomas RJ, Desai N, Green MA, Lovell D, Powell BWEM, Cook MG. The correlation of regression in primary melanoma with sentinel lymph node status. *J Clin Pathol*. 2008;61:297-300.

Kelly JW, Sagebiel RW, Blois MS. Regression in malignant melanoma. A histologic feature without independent prognostic significance. *Cancer*. 1985;56:2287-91.

Kharkewitch DD, Seito D, Balch DC. Characterization of autologous tumor-specific T-helper 2 cells in tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1994; 58:317-23.

Kim NW. Clinical implications of telomerase in cancer. *Eur J Cancer*. 1997;33:781-6.

King M, Spooner D, Rowlands DC. Spontaneous regression of metastatic malignant melanoma of the parotid gland and neck lymph nodes: a case report and a review of the literature. *Clin Oncol*. 2001;13:466-9.

Kopf AW, Welkovich B, Frankel RE, Stoppelman EJ, Bart RS, Rogers GS, Rigel DS, Friedman RJ, Levenstein MJ, Gumport SL, Hennessey P. Thickness of malignant melanoma: global analysis of related factors. *J Dermatol Surg Oncol*. 1987;13:345-420.

Levi F, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La VC. Cancer mortality in Europe, 1995-1999, and an overview of trends since 1960. *Int J Cancer*. 2004;110:155-169.

Lowes MA, Bishop GA, Crotty K, Barnetson RS, Halliday GM. T Helper 1 cytokine mRNA is increased in spontaneously regressing primary melanomas. *J Invest Dermatol* 1997;108:914-9.

Lowes MA, Dunckley H, Watson N, Crotty K, Cooke B, Barnetson RS, Halliday GM. Regression of melanoma, but not keratoacanthoma, is associated with increased HLA-B22 and decreased HLA-B27 and HLA-DR1. *Melanoma Res*. 1999;9:539-44.

Luk NM, Ho LC, Choi CL, Wong KH, Yu KH, Yeung WK. Clinicopathological features and prognostic factors of cutaneous melanoma among Hong Kong Chinese. *Clin Exp Dermatol*. 2004; 29:600-4.

Luscher U, Filgueira L, Juretic A, Zuber M, Lüscher NJ, Heberer M, Spagnoli GC. The pattern of cytokine gene expression in freshly excised human metastatic melanoma suggest a state of reversible anergy of tumor-infiltrating lymphocytes. *Int J Cancer*. 1994; 57:612-9.

Lymboussaki A, Partanen TA, Olofsson B, Thomas-Crusells J, Fletcher CD, de Waal RM, Kaipainen A, Alitalo K. Expression of the vascular endothelial growth factor C receptor VEGFR-3 in lymphatic endothelium of the skin and in vascular tumors. *Am J Pathol*. 1998;153:395-403.

Macchiarini P, Fontanini G, Hardin M, Squartini F, Angletti C: Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet*. 1992;340:145-6.

MacKie RM. Malignant melanocytic tumours. *J Cutan Pathol*. 1985; 12: 251-65.

MacKie RM. Malignant melanoma: clinical variants and prognostic indicators. *Clinical and Experimental Dermatology* 2000;25:471-5.

Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni, A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G and Pepper M.S. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumor metastasis. *EMBO J*. 2001;20: 672-82.

Marcoval J, Moreno A, Graells J, Vidal A, Escribà JM, Garcia-Ramírez M, Fabra A. Angiogenesis and malignant melanoma. Angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth fase. *J Cutan Pathol*. 1997;24:212-8.

Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams RR, Hand JL, Laman SD, Kottschade LA, Maples WJ, Pittelkow MR, Pulido JS, Cameron JD, Creagan ET; Melanoma Study Group of Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century, Part I: Epidemiology, risk factors, screening, prevention and diagnosis. *Mayo Clin Proc*. 2007;82:364-80.

McGovern VJ. Spontaneous regression of melanoma. *Pathology*. 1975;7: 91-9.

McGovern VJ. Spontaneous regression of malignant melanoma. In: *Melanoma-histological diagnosis and prognosis*. New York: Raven Press;1983. p.138-47.

Mc Govern VJ, Shaw HM, Milton GW. Prognosis in patients with thin malignant melanoma: influence of regression. *Histopathology* 1983;7:673-80.

McLean DI, Lew RA, Sober AJ, Mihm MC Jr, Fitzpatrick TB. On the importance of white depressed areas in the primary lesion of superficial spreading melanoma. *Cancer* 1979;43:157-61.

Menzies S, McCarthy W. Complete regression of primary cutaneous malignant melanoma. *Arch Surg*.1997;132:553-6.

Miettinen M, Lindenmayer AE, Chaubal A. Endothelial cell markers CD31, CD34 e BNH9 antibody. *Mod Pathol*.1994;7:82-90.

Mihm Jr MC, Clark Jr WH, Reed RJ. The clinical diagnosis of malignant melanoma. *Semin Oncol* .1975;2:105-18.

Morris KT, Busam K, Bero S, Patel A, Brady MS. Primary cutaneous melanoma with regression does not require a lower threshold for sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg Oncol*. 2007; 15:316-22.

Naruns PL, Nizze JA, Cochran AJ, Lee MB, Morton DL. Recurrence potential of thin primary melanoma. *Cancer* 1986;57:545-8.

Nathanson L. Spontaneous regression of malignant melanoma: a review of the literature on incidence, clinical features and possible mechanisms. *Natl Cancer Inst Monogr* 1976;44:67-76.

Neitzel LT, Neitzel CD, Magee KL, Malafa MP. Angiogenesis correlates with metastasis im melanoma. *Ann Surg Oncol*. 1999;6:70-4.

Newell G R, Sider JG, Bergfelt L, Kripke ML. Incidence of cutaneous melanoma in the United States by histology with special reference to the face. *Cancer Res*. 1988;48: 5036-41.

Niakosari F, Kahn HJ, Marks A, From L. Detection of lymphatic invasion in primary melanoma with monoclonal antibody D2-40: a new selective immunohistochemical marker of lymphatic endothelium. *Arch Dermatol*. 2005; 141: 440-4.

Nordlund JJ, Lerner AB. Vitiligo and melanoma. *Arch Dermatol.* 1979;115:636.

O' Leary J A, Berend K R, Johnson J L, Levin L S, Seigler H F. Subungual melanoma: a review of 93 cases, with identification of prognostic variables. *Clin Orthop Relat Res.* 2000; 378: 206-12.

Oliver G, Detmar M. The rediscovery of the lymphatic system. Old and new insights into the development and biological function of lymphatic vascular system. *Genes Dev.* 2002;16:773-83.

Paladugu RR, Yonemoto RH. Biologic behavior of thin malignant melanomas with regressive changes. *Arch Surg.* 1983;118:41-4.

Papac RJ. Spontaneous regression of cancer: possible mechanisms. *In Vivo.* 1998;12:571-8.

Papoutsis M, Siemeister G, Weindel K, Tomarev SI, Kurz H, Schächtele C, Martiny-Baron G, Christ B, Marmé D, Wilting J.. Active interaction of human A375 melanoma cells with the lymphatics in vivo. *Histochem Cell Biol.* 2000;114:373-85.

Pathak S, Multani AS, McConkey DJ, Imam AS, Amoss MS Jr. Spontaneous regression of cutaneous melanoma in Sinclair swine is associated with defective telomerase activity and extensive telomerase erosion. *Int J Oncol.* 2000; 17: 1219-24.

Prehn RT. The paradoxical association of regression with a poor prognosis in melanoma contrasted with a good prognosis in keratoacanthoma. *Cancer Res.* 1996 ;56:937-40.

Rak J, Filmus J, Kerbel RS. Reciprocal paracrine interactions between tumour cells and endothelial cells: the "angiogenesis progression" hypothesis. *Eur J Cancer.* 1996; 32A:2438-50.

Renno T, Labecq S, Renard N, Saeland S, Vicari A. What's new in the field of cancer vaccines? *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60: 1296-310.

Ridolfi RL, Rosen PP, Thaler H. Nevus cell aggregates associated with lymph nodes: estimated frequency and clinical significance. *Cancer* . 1977;39:164-71.

Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weir HK, Rosenberg HM, Vernon SW, Cronin K, Edwards BK. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer.*2000;88:2398-424.

Rigel DS, Carucci J.A. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA Cancer J Clin.*2000; 50:215-36.

Rigel DS, Naylor M, Robinson J. What is the evidence for a sunscreen and melanoma controversy? *Arch Dermatol.* 2000;136:1447-9.

Ronan SG, Eng AM, Briele HA, Shioura NN, Das Gupta TK. Thin malignant melanomas with regression and metastasis. *Arch Dermatol.* 1987;133:1326-30.

Ronan SG, Han MC, Das Gupta TK. Histologic prognostic indicators in cutaneous malignant melanoma. *Semin Oncol* . 1988; 15: 558-65.

Rongioletti F, Miracco C, Gambini C, Pastorino A, Tosi P, Rebora A. Tumor vascularity as a prognostic indicator in intermediate-thickness (0,76-4 mm) cutaneous melanoma. *Am J Dermatol.*1996;18:474-7.

Sagebiel R. Regression and other factors of prognostic interest in malignant melanoma (editorial). *Arch Dermatol.*1985.121:1125-6.

Saleh FH, Crotty KA, Hersey P, Menzies SW, Rahman W. Autonomous histopathological regression of primary tumours associated with specific immune responses to cancer antigens. *J Pathol.* 2003;200:383-95.

Shaw HM, McCarthy SW, McCarthy WH, Thompson JF, Milton GW. Thin regressing malignant melanoma: significance of concurrent regional lymph node metastasis. *Histopathology*.1989;15:257-65.

Shields JD, Borsetti M, Rigby H, Harper SJ, Mortimer OS, Levick JR. Lymphatic density and metastatic spread in human malignant melanoma. *Br J Cancer* 2004; 90:693-700.

Singluff CL Jr, Vollmer RT, Reintgen DS, Seigler HF. Lethal “thin” malignant melanoma. Identifying patients at risk. *Ann Surg* 1988; 208: 150-61.

Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, Detmar M. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol*. 2001;159:893-903.

Smith JL, Stehlin JS. Spontaneous regression of primary malignant melanoma with regional metastasis. *Cancer*.1964;18:1399-415.

Søndergaard K, Hou-Jensen K. Partial regression in thin primary cutaneous malignant melanomas clinical stage I. A study of 486 cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1985; 408: 241-7.

Srivastava A, Laidler P, Hughes LE, Woodcock J, Shedden EJ. Neovascularization in human cutaneous melanoma: a quantitative morphological and Doppler ultrasound study. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1986 ;22:1205-9.

Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate thickness (0,76-4,0 mm thick) skin melanoma.A quantitative histologic study. *Am.J.Pathol* .1988;133:419-23.

Sroujeh AS.Spontaneous regression of intestinal malignant melanoma from na occult primary site. *Cancer*. 1988; 62:1247-50.

Stacker AS, Baldwin ME, AchenMG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J* .2002;16:922-34.

Stevens NG , Liff JM, Weiss NS. Plantar melanoma: is the incidence of melanoma of the sole of the foot really higher than whites? *Int J Cancer*.1990;45:691-3.

Straume O, Salvesen HB, Akslen LA. Angiogenesis is prognostically important in vertical growth phase melanomas. *Int J Oncol*.1999;15:595-9.

Streit M, Detmar M. Angiogênese, lymphangiogenesis and melanoma metastasis. *Oncogene*. 2003;22:3172-9.

Sumner WC. Spontaneous regression of melanoma- case report. *Cancer*. 1953;6:1040-3

Tefany FJ, Barnetson RS, Halliday GM, McCarthy SW, McCarthy WH.. Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in primary regressing and non regressing malignant melanoma. *J Invest Dermatol*. 1991;97:197-202.

Temple LK, Baron R, Cody HS 3rd, Fey JV, Thater HT, Borgen PI, Heerdt AS, Montgomery LL, Petrek JA, Van Zeekj. Sensory morbidity after sentinel lymph node biopsy and axillary dissection: a prospective study of 233 women. *Ann Surg Oncol*. 2002; 9: 654-62.

thor Straten P, Becker JC, Seremet T, Bröcker EB, Zeuthen J. Clonal T cell responses in tumor infiltrating lymphocytes from both regressive and progressive regions of primary human malignant melanoma. *J Clin Invest*. 1996;98:279-84.

Trau H, Kopf A. Rigel DS, Levine J, Rogers G, Levenstein M, Bart RS, Mintzis MM, Friedman RJ. Regression in malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*.1983a; 8:363-8.

Trau H, Rigel DS, Harris MN, Kopf AW, Friedman RJ, Gumport SL, Bart RS, Robson W, Grier N. Metastases of thin melanomas. *Cancer*.1983b; 51:553-6.

Tsai T, Vu C, Henson DE. Cutaneous, ocular and visceral melanoma in African Americans and Caucasians. *Melanoma Res.* 2005;5:213-7.

Wagner SN, Wagner C, Reinhold U, Funk R, Zöller M, Goos M. Immune response against human primary malignant melanoma – a distinct cytokine mRNA profile associated with spontaneous regression. *Lab Invest.* 1998;78:541-50.

Wanebo HJ, Cooper PH, Hagar RW. Thin (less than or equal to 1 mm) melanomas of the extremities are biologically favorable lesion not influenced by regression. *Ann Surg.* 1985; 201:499-504.

Warren BA, Shubik P. The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. *Lab Invest.* 1966;15:464-78.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324:1-8.

Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred E, Moore D, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new, significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1992; 84: 1875-7.

Wenzel J, Bekisch B, Uerlich M, Haller O, Bieber T, Tüting T. Type I interferon-associated recruitment of cytotoxic lymphocytes: a common mechanism in regressive melanocytic lesions. *Am J Clin Pathol.* 2005;124:37-48.

Wrone DA, Tanabe KK, Cosimi AB, Gadd MA, Souba WW, Sober AJ. Lymphedema after sentinel lymph node biopsy for cutaneous melanoma: a report of 5 cases. *Arch Dermatol.* 2000; 136: 511-4.

Xiang J, Chen Z, Huang H, Moyana T. Regression of engineered myeloma cells secreting interferon-gamma-inducing factor is mediated by both CD4(+) /CD8(+) T and natural killer cells. *Leuk Res.* 2001;25:909-15.