Mara Haffenbaeher Giavina-Bianchi

**Análise da expressão da proteína NY-ESO-1
no melanoma cutâneo**

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Cyro Festa Neto

SÃO PAULO

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Giavina-Bianchi, Mara Haffenbaeher

Análise da expressão da proteína NY-ESO-1 no melanoma cutâneo / Mara Haffenbaeher Giavina-Bianchi. -- São Paulo, 2016.

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

Programa de Dermatologia.

Orientador: Cyro Festa Neto.

Descritores: 1.Melanoma 2.Antígenos de neoplasias 3.Imuno-histoquímica
4.Sobrevida 5.Neoplasias 6.Antígenos CD3 7.Antígenos CD8 8.Proteína humana
FOXP3 9.Imunoterapia

USP/FM/DBD-047/16

Dedico esta tese:

Aos meus pais (*in memorium*), Licínio e Ercília, que me deram todas as condições físicas, psíquicas, econômicas e morais para que este trabalho fosse concluído hoje.

À minha professora no Ensino Fundamental, Maria de Lourdes Lancia Pereira, que me fez gostar da Língua Portuguesa e, conseqüentemente, facilitou sobremaneira a realização desta.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Cyro Festa Neto, meu orientador, pela dedicação e paciência dispensadas a este estudo, pelos ensinamentos transmitidos e pela amizade.

À Professora Lyn M. Duncan, minha orientadora durante todo o período nos Estados Unidos, e supervisora final na elaboração do artigo científico, que me abriu as portas, me acolheu e muito me ensinou no Departamento de Dermatopatologia do Massachusetts General Hospital, em Boston, nos Estados Unidos.

Ao Instituto Ludwig, na pessoa de Luísa Lina Villa, que forneceu graciosamente o anticorpo NY-ESO-1 utilizado nesta pesquisa.

Ao Professor Jorge Kalil, pelo apoio ao projeto e pelo contato com o Instituto Ludwig.

Ao Professor Pedro Giavina-Bianchi, que me auxiliou incondicionalmente em todos os aspectos físicos, burocráticos, científicos e psíquicos da realização deste trabalho.

À Professora Mirian Nakagami Sotto, ilustre dermatopatologista, pelo conhecimento e presteza em rever as lâminas dos pacientes, assim como aos integrantes do laboratório de Histopatologia da Dermatologia FMUSP.

Ao Laboratório Diagnóstika, na pessoa do Dr. Roberto El Ibrahim, que se dispôs a padronizar e realizar o estudo imunohistoquímico com o NY-ESO-1.

À Luciane Kanashiro, técnica em imunohistoquímica do Laboratório Diagnóstika, pela presteza, paciência e, principalmente, competência na realização dos exames imunohistoquímicos.

Ao Professor José Antonio Sanches e à Fundação SEADE pelas informações sobre os pacientes.

À Dra. Alice Lobo, que me apresentou à Prof. Lyn Duncan e me incentivou a realizar a parte do projeto nos Estados Unidos.

Aos colegas médicos do Ambulatório de Melanoma da Dermatologia da FMUSP, Caio Lamunier de Abreu Camargo, Dilci Franco e Helena Olegário da Costa, atual coordenadora.

Aos integrantes da banca da aula de qualificação do doutorado: Profa. Dra. Mirian N. Sotto, Prof. Dr. José Antonio Sanches, Walmar Roncalli Pereira de Oliveira, Neusa Y. S. Valente e Walter Belda Jr pelas correções e sugestões no aprimoramento do projeto.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro concedido através da Bolsa de Doutorado Direto, processo número 2012/ 19168-6.

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas.....	xii
Resumo	xiii
Summary.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Melanoma.....	3
1.2 Resposta antitumoral e infiltrado linfocítico tumoral (ILT)	6
1.3 Antígeno NY-ESO-1 e a resposta imune	8
2 OBJETIVOS.....	14
3 MÉTODOS.....	16
3.1 Critérios de inclusão.....	17
3.2 Critérios de exclusão.....	17
3.3 Seleção dos Pacientes.....	18
3.4 Formação dos grupos de estudo	18
3.5 Estudo epidemiológico dos grupos da amostra inicial.....	19
3.6 Revisão das lâminas	20
3.7 Imunohistoquímica.....	20
3.7.1 Pesquisa Imunohistoquímica do antígeno NY-ESO-1	20
3.7.2 Pesquisa Imunohistoquímica para células CD3+	24
3.7.3 Pesquisa imunohistoquímica para células CD8+FoxP3- , CD8-FoxP3+ e CD8+FoxP3+	25
3.8 Interpretação das lâminas.....	27
3.8.1 NY-ESO-1	27
3.8.2 Quantificação das células CD3+, CD8+FoxP3-, CD8-FoxP3+ e CD8+FoxP3+.....	29
3.9 Estudo da associação do antígeno NY-ESO-1 e dados clínico-histopatológicos	31
3.10 Análise Estatística	32

4	RESULTADOS	33
4.1	Dados Epidemiológicos da Amostra.....	34
4.1.1	Caracterização dos pacientes.....	34
4.1.2	Caracterização dos melanomas	34
4.2	Resultados imunohistoquímicos	35
4.2.1	Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo o sexo dos pacientes.....	38
4.2.2	Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo a idade dos pacientes.....	39
4.2.3	Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo o fototipo dos pacientes	40
4.2.4	Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo a localização do melanoma ..	41
4.2.5	Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo a evolução dos pacientes...	42
4.2.6	Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo a sobrevida doença-específica dos pacientes com melanoma.....	43
4.2.7	Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo o infiltrado linfocítico tumoral (ILT).....	44
4.2.8	Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo o tipo histológico do melanoma	45
4.2.9	Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo a presença de ulceração no melanoma.....	46
4.2.10	Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo o índice de Breslow.....	47
4.2.11	Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo o <i>status</i> do linfonodo sentinela dos pacientes	49
4.3	Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo parâmetros imunohistoquímicos	49
4.3.1	Análise da intensidade e distribuição do antígeno NY-ESO-1 no melanoma	49
4.3.2	Análise da porcentagem de células tumorais de melanoma expressando o antígeno NY-ESO-1	51
4.3.3	Análise das células CD3+, CD8+FoxP3-, CD8-FoxP3+, CD8+FoxP3+ segundo a expressão do antígeno NY-ESO-1 pelo melanoma	52
4.3.4	Análise do arranjo das células CD3+ segundo a expressão do antígeno NY-ESO-1 pelo melanoma	53
5	DISCUSSÃO.....	54
6	CONCLUSÕES	63
7	ANEXOS.....	65
8	REFERÊNCIAS	69

LISTA DE ABREVIATURAS

pH:	potência hidrogeniônica
DAB:	diaminobenzina
mm:	milímetro
μl:	microlitro
EDTA:	ácido etilenodiamino tetra-acético
tampão PBS:	tampão fosfato-salino
BRAF:	gene humano que codifica a proteína B-Raf
ILT:	infiltrado linfocítico tumoral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Exame imunohistoquímico do antígeno NY-ESO-1 no testículo humano (controle positivo).	21
Figura 2.	Exame imunohistoquímico para células CD3+ em um caso de melanoma cutâneo primário.	25
Figura 3.	Exame imunohistoquímico para células CD8+ e FoxP3+ em um caso de melanoma cutâneo primário.	26
Figura 4.	Exames imunohistoquímicos do antígeno NY-ESO-1 em casos de melanomas cutâneos primários.	28
Figura 5.	Ilustração da contagem das células CD3+, CD8+FoxP3-, CD8-FoxP3- e CD8+FoxP3+ no infiltrado linfocítico tumoral segundo o método da contagem pontual morfométrica.	30
Figura 6.	Distribuição da expressão do antígeno NY-ESO-1 nos nevos melanocíticos, melanomas <i>in situ</i> , melanomas em crescimento radial e melanomas em crescimento vertical	36
Figura 7.	Distribuição proporcional dos pacientes com melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o sexo.	38
Figura 8.	Distribuição dos pacientes com melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo a idade ao diagnóstico.	39
Figura 9.	Distribuição dos pacientes com melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o fototipo de pele (classificação de Fitzpatrick)	40
Figura 10.	Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo sua localização primária.	41
Figura 11.	Distribuição dos pacientes com melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o seguimento ambulatorial.	42
Figura 12.	Curva Kaplan-Meyer de sobrevida doença-específica dos pacientes com melanoma segundo a expressão de NY-ESO-1 utilizando-se o teste de log-rank Mantel-Cox.	43
Figura 13.	Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o infiltrado linfocítico tumoral (ILT)	44
Figura 14.	Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo tipo histológico.	45
Figura 15.	Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo a presença de ulceração.	46
Figura 16.	Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o índice de Breslow (variável categórica).	47

Figura 17.	Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o índice de Breslow (variável contínua).	48
Figura 18.	Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o status do linfonodo sentinela dos pacientes	49
Figura 19.	Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos segundo sua intensidade no melanoma	50
Figura 20.	Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos segundo o padrão de expressão nas células tumorais do melanoma	50
Figura 21.	Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos segundo a porcentagem de células tumorais expressando o antígeno	51
Figura 22.	Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo a pesquisa imunohistoquímica de células CD3+, CD8+FoxP3-, CD8-FoxP3+ e CD8+FoxP3+ no infiltrado linfocítico tumoral.	52
Figura 23.	Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o arranjo das células CD3+.	53
Anexo, Figura 1.	Curva de Kaplan-Meyer da sobrevida dos pacientes com melanoma primário cutâneo de acordo com o gênero (p = 0,0353; teste log-rank Mantel-Cox).....	67
Anexo, Figura 2.	Curva de Kaplan-Meyer da sobrevida dos pacientes com melanoma primário cutâneo segundo índice de Breslow ($\leq 4,0$ mm ou $> 4,0$ mm; p = 0,0468; teste log-rank Mantel-Cox)	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Expressão de NY-ESO-1 no melanoma cutâneo primário invasivo segundo parâmetros clínicos e histopatológicos	37
Anexo, Tabela 1. Parâmetros clínicos e histopatológicos da amostragem geral dos pacientes com melanoma primário cutâneo	66

RESUMO

Giavina-Bianchi MH. *Análise da expressão da proteína NY-ESO-1 no melanoma cutâneo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016. 77p.

INTRODUÇÃO: o câncer é a doença que mais mata pessoas com idade abaixo de 85 anos e é um problema de saúde pública. Os tumores podem expressar em determinada fase de seu desenvolvimento proteínas anômalas que podem ser alvo de métodos diagnósticos e de intervenções terapêuticas. A expressão de NY-ESO-1 é detectada em 20 a 40% dos melanomas. Há evidências que esta expressão é mais freqüente em tumores de estágios mais avançados e está associada a um pior prognóstico. **OBJETIVOS:** determinar a frequência de expressão da proteína NY-ESO-1 no melanoma cutâneo e tentar correlacioná-la com o índice de Breslow, aspectos histopatológicos do melanoma, incluindo o infiltrado linfocítico tumoral, e a morbimortalidade dos pacientes. **MÉTODOS:** o presente estudo é longitudinal de coorte retrospectiva e foi realizado de agosto de 2009 a outubro de 2015. Foram selecionados 89 melanomas de 87 pacientes do Ambulatório de Tumores do Departamento de Dermatologia da FMUSP, divididos em 3 grupos, sendo: grupo 1: 34 melanomas com índice de Breslow $\leq 1,0$ mm; grupo 2: 29 melanomas com índice de Breslow entre 1,1 - 4,0 mm e grupo 3: 26 melanomas com índice de Breslow $\geq 4,0$ mm. As lâminas dos exames anátomo-patológicos destes pacientes foram revisadas quanto ao diagnóstico de melanoma, seu índice de Breslow e a presença de infiltrado linfocítico tumoral. A seguir, realizou-se exame de imunohistoquímica para a determinação da presença do antígeno NY-ESO-1 em todos os 89 tumores coletados e em mais 20 nevos (11 displásicos e 9 intradérmicos) escolhidos ao acaso. Através da revisão dos dados do prontuário, foram obtidos os dados clínicos de: idade, sexo, raça, fototipo da pele, local de aparecimento do melanoma, *status* do linfonodo sentinela quando realizado, desenvolvimento de metástases e sobrevida dos pacientes. Os dados anátomo-patológicos do tumor analisados foram: tipo histológico, presença de ulceração, e tipo de infiltrado linfocítico tumoral. Nos melanomas que apresentavam infiltrado linfocítico tumoral, foram realizados testes imunohistoquímicos para pesquisa de células CD3+, CD8+, FoxP3+ e CD8+FoxP3+ (duplamente positivas). **RESULTADOS:** O antígeno NY-ESO-1 esteve presente em 19% dos melanomas cutâneos primários e não foi detectado em nenhum dos 20 nevos pesquisados. A expressão do antígeno NY-ESO-1 esteve estatisticamente relacionada a tumores com espessuras maiores. Apresentou também uma associação inversa com o tipo extensivo superficial em relação aos outros tipos histológicos. O infiltrado linfocítico tumoral dos melanomas NY-ESO-1 positivos continha menor número de células CD3+, que se encontravam isoladas ou arranjadas em pequenos grupos de até 5 células, o que contrastava significativamente com os tumores NY-ESO-1 negativos, com maior densidade de células CD3+, dispostas em grandes grupos, com 6 ou mais células. A expressão da proteína NY-ESO-1 não esteve associada à idade, ao sexo, ao fototipo, ao sítio primário do tumor, à presença de

ulceração, ao *status* do linfonodo sentinela, ao desenvolvimento de metástases ou à sobrevida. CONCLUSÕES: Há expressão de NY-ESO-1 em uma porcentagem considerável dos melanomas, principalmente nos mais espessos. O menor número de células CD3+ no infiltrado linfocítico tumoral, acrescido ao fato destas células estarem isoladas ou em pequenos grupos, sugere que embora imunogênico, a expressão do antígeno NY-ESO-1 não resulta num estímulo eficaz do sistema imune no combate ao tumor. O desenvolvimento de uma vacina para estes pacientes poderá, no futuro, aumentar as possibilidades terapêuticas do melanoma.

Descritores: 1.Melanoma 2.Antígenos de neoplasias 3.Imuno-histoquímica 4.Sobrevida 5.Neoplasias 6.Antígenos CD3 7.Antígenos CD8 8.Proteína humana FOXP3 9.Imunoterapia

SUMMARY

Giavina-Bianchi MH. *NY-ESO-1 protein analysis in cutaneous melanoma* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016. 77p.

INTRODUCTION: cancer is the disease that leads to the greatest number of deaths in people over 85 years old and it has become a major public health problem. Tumors may express aberrantly proteins during certain phases of their development, which can be target for diagnostic or treatment purposes. NY-ESO-1 is detected in 20 to 40% of melanomas. There is evidence that it is more frequent in advanced stages and that is associated with a worse prognosis. **OBJECTIVES:** to determine the frequency of NY-ESO-1 protein expression in cutaneous melanoma and to try to correlate it to Breslow index, melanoma histopathological aspects, including the tumor infiltrating lymphocytes, and patients morbimortality. **METHODS:** the present study is longitudinal of retrospective cohort. The research was carried on from August 2009 to October 2015. Eighty nine melanomas were selected from 87 patients in Oncology Outpatient Clinic, Dermatology Division, University of São Paulo and divided in 3 groups, such as: group 1: 34 melanomas with Breslow index $\leq 1,0$ mm; group 2: 29 melanomas with Breslow index between 1,1 - 4,0 mm e group 3: 26 melanomas with Breslow index $\geq 4,0$ mm. All specimens were reviewed for diagnostic, Breslow index and tumor infiltrating lymphocytes. After that, immunohistoquimical test for the presence of NY-ESO-1 antigen was performed in all 89 melanomas collected and in 20 nevi (11 dysplastic nevi and 9 dermal nevi) that were randomly chosen. By reviewing clinical charts, the following data was obtained: age, sex, skin phototype, site of the tumor, lymph node sentinel status, development of metastases and survival of the patients. The histological data analyzed was: histological melanoma type, presence of ulceration, grade of tumor infiltrating lymphocytes. In those melanomas that had tumor infiltrating lymphocytes, we performed immunohistoquimical tests for the presence of CD3+, CD8+, FoxP3+ and CD8+FoxP3+ (double positive) cells. **RESULTS:** antigen NY-ESO-1 was present in 19% of primary cutaneous melanomas and none of the 20 nevi. The expression of antigen NY-ESO-1 was statistically related to thicker melanomas. It presented also an inverse association with superficial spreading melanoma type compared to other subtypes. Tumor infiltrating lymphocytes of NY-ESO-1 positive melanomas had fewer CD3+ cells, that were isolated or arranged in small groups up to 5 cells, which was significantly different from tumors NY-ESO-1 negatives, with higher density of CD3+ cells, displayed in large groups of 6 or more cells. The expression of NY-ESO-1 protein was not associated to age, sex, phototype, site, ulceration, lymph node sentinel status, development of metastases and survival. **CONCLUSIONS:** A considerable amount of melanomas express NY-ESO-1, mainly thicker tumors. The fewer number of CD3+ cells in the tumor infiltrating lymphocytes, added to the fact of those cells being isolated or in small groups suggest that, although immunogenic, the expression of NY-ESO-1 antigen does not result in a efficient stimulus of the immune system to fight the tumor. The development of a vaccine to those patients may, in the future, enhance the roll of therapeutic possibilities for melanoma.

Descriptors: 1.Melanoma 2.Antigens, neoplasm 3.Immunohistochemistry 4.Survivorship 5.Neoplasms 6.Antigens, CD3 7.Antigens, CD8 8.FOXP3 protein, human 9.Immunotherapy

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o câncer foi a principal causa de morte no mundo em 2012, totalizando 8.200.000 casos, o que representou 22% de todos os eventos. Foram 14.100.000 novos casos e 32.600.000 pessoas vivendo com a doença diagnosticada há menos de 5 anos, conforme dados desse mesmo ano⁽¹⁾.

O câncer é a doença que mais mata pessoas com idade abaixo de 85 anos, tornando-se o principal problema de saúde pública dos países desenvolvidos⁽²⁾. Apesar dos casos estarem aumentando, as taxas de mortalidade estão em declínio nos países desenvolvidos, onde a doença é detectada e tratada precocemente. Já nos países em desenvolvimento, tanto a incidência como a mortalidade estão aumentando⁽¹⁾.

No Brasil, estima-se que ocorram cerca de 500.000 casos novos de câncer por ano, com mortalidade aproximada de 15% no ano de 2009. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a taxa de mortalidade no ano de 2008 foi de 95 e 136 casos a cada 100.000 habitantes, respectivamente, para mulheres e homens no Brasil. No mesmo ano nos Estados Unidos, a taxa de mortalidade por 100.000 habitantes foi de 104 e 141, respectivamente para mulheres e homens⁽¹⁾.

O tratamento da doença consiste na remoção cirúrgica do tumor primário seguida de radioterapia e/ou quimioterapia adjuvante para combater a doença local residual e a metastática, caso seja necessário. No entanto, tais terapias adjuvantes são altamente inespecíficas e tóxicas para as células normais, resultando em efeitos colaterais nem sempre tolerados pelo paciente, além de muitas vezes terem baixa eficácia.

Os tumores podem expressar em determinada fase de seu desenvolvimento proteínas anômalas que podem ser alvos de métodos diagnósticos e de intervenções

terapêuticas. A imunoterapia contra o câncer é considerada uma promessa de tratamento eficaz e específico para esta doença. Tem sido abordada, até o momento, com a transferência passiva de anticorpos, a transferência adotiva de células T e as vacinas terapêuticas⁽³⁾.

1.1 Melanoma

O melanoma resulta da transformação maligna de melanócitos, normalmente situados na epiderme, derme ou epitélio mucoso; ou de células névicas melanocíticas em lesões precursoras, como nevos atípicos ou congênitos; ou, raramente, de melanócitos em sítios viscerais⁽⁴⁾. A doença tem recebido considerável atenção e vem sendo abordada em diversos estudos devido ao aumento nas taxas de incidência e mortalidade em todo o mundo, especialmente em indivíduos de pele branca^(5, 6).

O melanoma vem aumentando em ritmo mais acelerado em homens e mulheres do que qualquer outro tipo de câncer, só sendo superado pelo câncer de pulmão em mulheres. Nos Estados Unidos, no ano de 2008, 62.480 casos novos de melanoma foram diagnosticados, com 8.000 óbitos estimados⁽⁷⁾. A incidência ajustada para a idade foi de 20,8 por 100 mil pessoas por ano e a taxa de mortalidade foi de 2,7 por 100 mil habitantes para o período de 2004-2008. A idade média do diagnóstico foi de 60 anos. Em 2011, nos Estados Unidos, o melanoma foi o sexto tipo mais frequente de câncer nos indivíduos caucasianos, com incidência de 22,1 casos novos a cada 100 mil habitantes⁽⁸⁾.

É o segundo câncer com maior perda potencial em anos de vida, ficando atrás apenas das leucemias em adultos⁽⁹⁾. As estimativas do INCA para 2016 são de que haja 5.670 casos novos, sendo 3.000 homens e 2.670 mulheres no Brasil, resultando numa

incidência de aproximadamente 3,09 a 4,05 por 100 mil habitantes. O melanoma matou 1.559, sendo 910 homens e 649 mulheres no ano de 2013⁽¹⁰⁾.

O diagnóstico do melanoma deve ser confirmado com o exame histopatológico e algumas características identificadas neste exame podem estar associadas à agressividade do tumor. A descrição do patologista se o melanoma é *in situ*, ou se já é invasivo em fase de crescimento radial ou vertical é de fundamental importância para o tratamento e prognóstico. O melanoma *in situ* está completamente restrito à epiderme e seus anexos. Aqueles em crescimento radial têm ninhos de melanócitos restritos à epiderme, poucas células invadindo a derme (microinvasor) e não apresentam mitoses na derme. Já os tumores em crescimento vertical podem ter ninhos tumorais tanto na epiderme quanto na derme (os da derme são geralmente maiores que os da epiderme); expandem a derme papilar atingindo até, no mínimo, derme reticular; podem também apresentar mitoses na derme; e as células podem apresentar características diferentes na epiderme e na derme⁽¹¹⁾. Os melanomas *in situ*, em teoria, são curados com a excisão cirúrgica; os pacientes com melanomas em fase de crescimento radial têm mais de 95% de chance de estarem vivos nos 5 anos seguintes contra apenas 20% dos pacientes com melanoma metastático, que apresentam sobrevida média de apenas 9 meses⁽¹²⁾. O índice de Breslow, que é a espessura em milímetros do tumor na derme, é determinante no estadiamento da doença. Até 1,0 mm, o melanoma é considerado fino, de 1,01 a 4,0 mm, intermediário, e maior que 4,0 mm, espesso⁽¹³⁾. O nível de Clark, os subtipos histológicos, as margens, a resposta inflamatória linfocítica, a presença de neurotropismo e invasão angio-linfática são outras informações relevantes no laudo⁽⁴⁾. Dados indicadores de maior agressividade são a presença de ulceração⁽¹⁴⁾, que deve ocorrer pelo consumo da epiderme pela neoplasia, e, recentemente, a presença de um índice mitótico superior a zero por milímetro quadrado no componente invasor do melanoma⁽¹¹⁾.

Eventualmente, marcadores imunohistoquímicos podem ser necessários para o diagnóstico do melanoma, especialmente para lesões pouco diferenciadas, com pouco ou nenhum pigmento. Os mais utilizados são os anticorpos contra a proteína S100, que está expressa em todos os melanomas e nevos, além de em alguns outros tumores, e os anticorpos monoclonais HMB-45⁽⁴⁾, Mitf⁽¹⁵⁾ e Sox10⁽¹⁶⁾.

O estadiamento do melanoma é de vital importância no planejamento terapêutico e no prognóstico do paciente. Atualmente, de acordo com a sétima edição do AJCC (American Joint Committee on Cancer) do ano de 2009, o estadiamento da neoplasia é feito conforme os critérios: espessura do tumor, presença ou não de ulceração, índice mitótico, acometimento de linfonodos, presença de metástases à distância e nível sérico de DHL⁽¹³⁾.

No estágio atual, a cirurgia dos melanomas diagnosticados em seus estadios iniciais é curativa para a maioria dos pacientes, enquanto que para as neoplasias mais avançadas há pouco sucesso terapêutico. O prognóstico dos pacientes com metástases à distância irressuscáveis é pobre, com uma média de sobrevida ao redor de 9 meses e menos de 20% de sobrevida em 5 anos⁽¹²⁾.

Os quimioterápicos e citocinas aprovados pelo FDA para o uso em melanoma até 2011 eram: Dacarbazina, altas doses de Interferon alfa e altas doses de Interleucina-2⁽¹⁷⁾. Recentemente, tivemos a introdução de duas novas drogas voltadas para o melanoma avançado, o Ipilumimab, um anticorpo monoclonal anti-CTLA4⁽¹⁸⁾, e o Vemurafenib, um inibidor do BRAF que pode ser eficaz em pacientes nos quais a mutação deste gene está presente⁽¹⁹⁾.

Apesar dos esforços empreendidos, a melhor terapêutica ainda é o diagnóstico precoce. Quando a doença é restrita à pele, sem acometimento linfonodal e sem metástases, o que ocorre em 82 a 85% dos casos, a espessura que a neoplasia ocupa na

derme, ou até em planos mais profundos, é o fator prognóstico mais importante. Se ela é menor do que 1,0 mm, a sobrevida em 5 anos é superior a 90%. Já nos casos com espessura maior ou igual a 4,0 mm, cai para 50%. Nos casos de acometimento de linfonodo regional, que equivalem a 10 a 13% dos pacientes diagnosticados, a sobrevida é cerca de apenas 39% em 5 anos. Na presença de metástases à distância, situação que ocorre em 2 a 5% dos pacientes, a taxa de sobrevida é inferior a 10 % em 5 anos⁽¹³⁾.

1.2 Resposta antitumoral e infiltrado linfocítico tumoral (ILT)

Na eventualidade do surgimento e desenvolvimento de tumores, o sistema imune é exposto a numerosos antígenos nunca vistos anteriormente, que são provenientes de anormalidades genéticas. Neste contexto, o sistema imune pode perceber e eliminar alguns tumores em fases precoces de seu desenvolvimento. O sistema imune adaptativo parece ter fundamental importância na resposta antitumoral, que é desencadeada por ativação de uma vasta gama de receptores altamente específicos e diversos em células T e B.

Uma resposta imune eficaz se inicia quando a célula T ou B reconhece o antígeno tumoral em um contexto pró-estimulatório e sofre ativação e proliferação. As células B têm como receptor uma imunoglobulina IgM de superfície e são capazes de reconhecer antígenos solúveis, ligar-se a eles e se diferenciar em plasmócitos que secretam grandes quantidades de anticorpos altamente específicos. As células T clássicas (alfa-beta) reconhecem antígenos na forma de pequenos peptídeos, apresentados através de moléculas MHC na superfície da célula apresentadora de antígeno. O receptor de linfócitos T está associado a molécula de superfície CD3 que é um marcador geral desta célula, independente desta ser auxiliar, citotóxica, ou reguladora.

As células T CD4⁺ se ligam a antígenos apresentados pelas moléculas MHC classe II, que são expressas principalmente pelas células apresentadoras de antígeno. As células T CD8⁺ se ligam a moléculas MHC classe I, que estão presentes em todas as células nucleadas, incluindo as apresentadoras de antígenos. As células CD4⁺, após sua ligação com as células apresentadoras de antígenos, podem se diferenciar em muitos tipos de células efetoras, dependendo da combinação de citocinas do microambiente. Uma possibilidade é que ela se torne uma célula CD4⁺ T auxiliar (Th) e, como o nome diz, auxilie células B ativadas, células NK e linfócitos citotóxicos. As células T CD8⁺, após serem ativadas pelas células apresentadoras de antígenos, são responsáveis por exercer efeitos citotóxicos diretamente sobre as células tumorais e, portanto, têm um papel central na resposta imune anti-tumoral, controlando o crescimento e a disseminação do câncer⁽²⁰⁻²²⁾.

Quando o microambiente não é inflamatório, a célula T pode se diferenciar em reguladora (Treg), que são importantes na inibição do sistema imune. As células Treg são um alvo muito interessante e promissor na imunoterapia para o câncer porque elas estão presentes frequentemente no tumor e sabe-se que inibem as respostas adaptativa e inata do hospedeiro contra o tumor. As células Treg caracteristicamente expressam a molécula FoxP3 (transcription fator forkhead box protein 3), que pertence a uma grande família de diferentes fatores de transcrição e aceita-se que sua função seja principalmente regulatória do sistema imune. Entretanto, já foram descritas também células CD8⁺FoxP3⁺ (duplamente positivas) cuja função demonstrou-se citotóxica e não regulatória, como se imaginava⁽²³⁾.

A presença de infiltrado linfocítico tumoral (ILT) no melanoma tem sido associada com melhor prognóstico em diversos estudos⁽²⁴⁻³²⁾ e é interpretada como um indicador de que o hospedeiro está promovendo uma resposta imune mais eficaz contra

o tumor. No entanto, outros estudos não conseguiram provar esta associação e o significado do ILT permanece controverso.

Gooden et al., 2011⁽³³⁾ realizaram uma meta-análise sobre a influência prognóstica do ILT nos cânceres. A presença de células CD3+ e CD8+ tiveram um efeito benéfico na sobrevida dos pacientes, enquanto que as células regulatórias FoxP3+ não tiveram associação com a sobrevida global dos pacientes. Quando a razão CD8+/FoxP3+ (efetor/regulador) era maior, a resposta era ainda melhor. Mais estudos se fazem necessários para corroborar estes achados.

1.3 Antígeno NY-ESO-1 e a resposta imune

A identificação de um número significativo de antígenos tumorais se tornou possível a partir de 1990, devido ao estabelecimento de sistemas autólogos *in vitro* para a sua identificação e do desenvolvimento de metodologias como o “T cell epitope cloning” e SEREX (“Serological Identification of antigens by Recombinant Expression cloning of cDNA libraries of human tumors”). Tais metodologias permitem o rastreamento de proteínas expressas pelas células tumorais capazes de induzir resposta imune humoral e celular nos pacientes com câncer. Os antígenos tumorais conhecidos até o momento podem ser agrupados em 5 categorias principais: antígenos de diferenciação, antígenos correspondentes a proteínas mutadas, antígenos super-expressos ou amplificados, antígenos de origem viral e antígenos Câncer-Testis (CT)⁽³⁴⁾.

Os antígenos CT são geralmente codificados por genes no cromossomo X⁽³⁵⁾ e têm como principal característica sua restrita expressão nas células germinativas do testículo adulto, do ovário fetal e do trofoblasto, dentre os tecidos normais, e expressão

aberrante em tumores de diferentes tipos histológicos^(36, 37). Até o momento, são conhecidos mais de 90 antígenos CT, agrupados em aproximadamente 40 famílias gênicas. Diversos anticorpos monoclonais para detecção *in situ* destes antígenos foram desenvolvidos nos últimos anos⁽³⁸⁾.

Os antígenos CT são capazes de induzir resposta imune humoral e celular em pacientes com câncer e, devido a essa imunogenicidade e ao restrito padrão de expressão em tecidos normais, são considerados candidatos ideais para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra o câncer. Isto ocorre porque as células do testículo não expressam moléculas HLA classe I e, portanto, não apresentam antígenos para os linfócitos T citotóxicos. Tal característica, somada ao bloqueio físico imposto pela barreira hematotesticular, que impede a passagem de anticorpos para o testículo, tornam o mesmo um tecido imunoprivilegiado, ou seja, imunologicamente protegido. Assim, a princípio, vacinas que tenham como alvo estes antígenos não devem desencadear resposta imune contra a proteína expressa no testículo, garantindo que apenas as células tumorais sejam destruídas⁽³⁹⁻⁴¹⁾.

O antígeno NY-ESO-1 é um dos antígenos CT melhor caracterizados em termos de padrão de expressão e imunogenicidade. Pertence à família de antígeno câncer-testis CT6⁽³⁸⁾ e recebeu este nome porque foi identificado em Nova York (NY), no Instituto Ludwig para Pesquisa do Câncer, no ano de 1997, num paciente com câncer no esôfago (ESO). O número 1 decorre do fato de ter sido o primeiro membro descoberto de uma nova família. O antígeno foi identificado pela técnica SEREX. Nesta metodologia, uma biblioteca de expressão de proteínas produzida a partir de cDNA de um tumor de esôfago foi rastreada com soro autólogo de pacientes, permitindo a identificação de antígenos reconhecidos pelo sistema imune humoral⁽³⁴⁾. No ano seguinte, Jager e colaboradores foram capazes de isolar células CD8 a partir de um paciente com

melanoma que reconheciam especificamente o antígeno NY-ESO-1⁽⁴²⁾.

O produto principal da codificação do gene NY-ESO-1 é uma proteína com 180 aminoácidos, com um N-terminal rico em glicina e com a região C-terminal extremamente hidrofóbica, tão insolúvel que se poderia confundir com um domínio transmembrânico, o que não se tem evidência⁽³⁴⁾. O antígeno tem a expressão principalmente citoplasmática.

Pouco se sabe sobre a sua função e sobre o seu envolvimento na gênese do tumor. Essa falta de informação se deve ao fato de não haver genes correspondentes em organismos modelos, como drosófilas e roedores, o que impossibilita a realização de ensaios “knock-out”. Os antígenos CT são, na maioria, exclusivos de primatas, o que dificulta a realização de ensaios pré-clínicos das vacinas terapêuticas em modelos animais⁽⁴³⁾.

Em tecidos normais do ser humano, a expressão de NY-ESO-1 é restrita às espermatogônias do testículo adulto e diminui gradualmente com a maturação e diferenciação das células germinativas. Ele é detectado em 20 a 30% dos tumores de pulmão⁽⁴⁴⁾, esôfago⁽⁴⁵⁾, fígado⁽⁴⁶⁾, estômago⁽⁴⁷⁾, próstata⁽⁴⁸⁾, ovário⁽⁴⁹⁾, bexiga⁽⁵⁰⁾ e melanomas (ver adiante). Embora raro, mas muito agressivo, o sarcoma sinovial apresenta cerca de 80% de positividade para o NY-ESO-1⁽⁵¹⁾, com distribuição intensa e homogênea em todo o tumor. Nos lipossarcomas mixóide e de células redondas, sua expressão fica em torno de 90%⁽⁵²⁾. No entanto, sua frequência é baixa em tumores colorretais⁽⁵³⁾, de pâncreas⁽⁵⁴⁾, de rim⁽⁵⁵⁾ e linfomas⁽⁵⁶⁾.

Esta expressão parece ser mais frequente em tumores de estágios mais avançados e estar associada a um pior prognóstico. Tais dados sugerem que a expressão desse antígeno possa estar associada à agressividade do tumor ou a uma menor suscetibilidade ao tratamento quimioterápico e radioterápico. Apesar da mulher não

exibir nenhum tecido normal que expresse o antígeno NY-ESO-1, ao contrário do homem que o expressa no testículo, não há diferença de expressão da proteína nos tumores entre os sexos⁽⁴³⁾.

O antígeno NY-ESO-1 é também o mais imunogênico dos antígenos tumorais conhecidos até o momento. Respostas humoral e celular com linfócitos CD4 e CD8 são observadas em aproximadamente 5 a 15 % dos pacientes portadores de diferentes tipos de tumores^(57, 58). No entanto, quando se analisam pacientes com tumores NY-ESO-1 positivos, esta frequência sobe para 50%⁽⁵⁹⁾.

A resposta humoral ao NY-ESO-1 é diversa em relação à classe de imunoglobulina sintetizada, podendo ser IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4, as quais frequentemente são detectadas simultaneamente no soro dos pacientes, sendo o isotipo IgG1 o mais frequente deles⁽⁴³⁾. Títulos contra o NY-ESO-1 podem ser muito altos, chegando a ser detectados na diluição de 1/1.000.000 no teste ELISA, embora a maioria fique entre 1/6.400 a 1/100.000. Ainda não foi demonstrada nenhuma função *in vivo* para esses anticorpos, pois sabemos que os seus alvos não estão acessíveis, uma vez que a expressão do NY-ESO-1 nas células tumorais é citoplasmática. Eles poderiam estar envolvidos em auxiliar o início da resposta imune, através da formação de imunocomplexos com antígenos liberados pelas células tumorais necróticas ou apoptóticas^(60, 61). Também foi observado que ao se remover o tumor por cirurgia, frequentemente ocorre uma queda dos títulos de anticorpos⁽⁶²⁾.

O NY-ESO-1 é considerado o antígeno mais promissor para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas. Muitos ensaios clínicos utilizando diferentes formulações de vacinas com o antígeno NY-ESO-1 (peptídeos, proteína recombinante, vetores bacterianos e virais, associados ao uso de diferentes adjuvantes) foram e estão sendo realizados no momento⁽⁶³⁻⁶⁸⁾.

Nestes ensaios, uma das prioridades tem sido o monitoramento da resposta imune dos pacientes após as imunizações. Esse monitoramento imunológico permite a comparação entre os diferentes ensaios e a identificação de formulações de vacina e estratégias de imunização mais eficazes e capazes de induzir uma resposta humoral e celular integrada⁽⁶⁹⁾.

Com relação aos tumores melanocíticos, não se encontrou expressão de NY-ESO-1 em nevos (intradérmicos, Spitz ou displásicos), sugerindo sua utilidade diagnóstica na diferenciação entre lesões benignas e malignas⁽⁷⁰⁾. No melanoma, tema específico deste estudo, há alguns artigos publicados. A presença do antígeno NY-ESO-1 variou de 13 a 45% nas primeiras publicações⁽⁷¹⁻⁷⁴⁾. Pesquisa recente, envolvendo 223 casos de melanomas, demonstrou a presença do antígeno NY-ESO-1 em 30% dos pacientes em estadios I e em 40% daqueles em estadios II⁽⁷⁵⁾. Nesse estudo, a expressão dos antígenos CT no melanoma primário foi um fator prognóstico negativo independente no que se refere ao tempo livre de doença, comparável ao índice de Breslow, à ulceração e ao índice mitótico. Outro autor publicou que a presença de células T circulantes reagentes ao NY-ESO-1 teve um impacto prognóstico positivo independente na sobrevida dos pacientes com melanomas em estadios avançados⁽⁷⁶⁾.

Ensaio clínico duplo-cego, randomizado, controlado com placebo, utilizou a proteína recombinante NY-ESO-1 em conjunto com o adjuvante ISCOMATRIX (partículas encapsuladoras compostas por lipídeos e saponina) para a imunização de pacientes com melanoma e induziu resposta imune integrada em todos os pacientes imunizados com NY-ESO-1/ISCOMATRIX^(67, 68). Esta formulação está licenciada sem exclusividade de uso pelo Instituto Ludwig para a GSK (Glaxo Smith Klein)⁽⁶⁶⁾. A NY-ESO-1/ISCOMATRIX está em testes de fase II em pacientes com melanoma e há ensaios em andamento com o NY-ESO-1 em combinação com os adjuvantes BCG e

CHP (“cholesterol-bearing hydrophobized pullulan”) para a imunização de pacientes com tumores de bexiga⁽⁶⁵⁾. Em 2008, Hunder et al.⁽⁷⁷⁾ publicaram um relato de caso de melanoma metastático refratário tratado com células CD4 + autólogas estimuladas *in vitro* com o antígeno NY-ESO-1, que resultou na regressão completa do tumor. Em 2011, Robbins et al.⁽⁷⁸⁾ observaram regressão de melanomas metastáticos NY-ESO-1 positivos tratados com linfócitos modificados geneticamente para reagir ao NY-ESO-1.

2 OBJETIVOS

-
- 1) Determinar a frequência de expressão da proteína NY-ESO-1 nos melanomas cutâneos primários numa amostra dos pacientes do Ambulatório de Oncologia Cutânea da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.
 - 2) Verificar se existe associação entre a expressão de NY-ESO-1 e a morbi-mortalidade da doença.
 - 3) Verificar se existe associação entre a expressão de NY-ESO-1 e aspectos histopatológicos e prognósticos dos melanomas.
 - 4) Verificar se existe associação entre a expressão de NY-ESO-1 e o tipo de infiltrado linfocítico tumoral e as células que o compõem.

3 MÉTODOS

O presente estudo é observacional de coorte retrospectiva e foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (CAPPesq 01608712.3.0000.0068) e pelo Institutional Review Board (IRB 2013P000172) do Massachusetts General Hospital, Boston, Estados Unidos.

No período entre agosto de 2009 e maio de 2012, os prontuários de pacientes portadores de melanoma que fazem ou fizeram acompanhamento no Ambulatório de Oncologia Cutânea da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP foram analisados e selecionados, conforme os critérios de inclusão e exclusão abaixo:

3.1 Critérios de inclusão

Pacientes com diagnóstico confirmado de melanoma *in situ* ou invasivo, com o índice de Breslow determinado pelo exame histopatológico, diagnosticados entre os anos de 1986 a 2009 no Ambulatório de Oncologia Cutânea da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

3.2 Critérios de exclusão

- 1) Pacientes com diagnóstico de melanoma invasivo nos quais o índice de Breslow não foi determinado pelo exame anatomopatológico.
- 2) Pacientes que foram diagnosticados com melanoma antes de 1986 ou após 2009.

3.3 Seleção dos Pacientes

Dos 524 pacientes catalogados no banco de dados do Ambulatório de Oncologia Cutânea da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP em agosto de 2009, 471 preencheram os critérios de inclusão.

Também foram selecionados, ao acaso, 20 casos de nevos que foram removidos no Ambulatório de Cirurgia da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. Destes, 11 eram do tipo displásico e 9 do tipo intradérmico.

3.4 Formação dos grupos de estudo

Os 471 pacientes foram separados nos três seguintes grupos:

Grupo 1: melanomas *in situ* ou com índice de Breslow até 1,0 mm;

Grupo 2: melanomas com índice de Breslow entre 1,1 e 4,0 mm;

Grupo 3: melanomas com índice de Breslow maior que 4,0 mm.

Com a intenção de incluir um número similar de casos em cada um dos grupos, foram sorteados 34 espécimes do Grupo 1, 29 do Grupo 2 e 26 do grupo 3, totalizando 89 casos em 87 pacientes com melanoma. Dois paciente contribuíram com 2 melanomas cada, explicando a diferença entre o número de pacientes e o número de espécimes. Somando-se aos 20 nevos, 109 tumores melanocíticos foram estudados.

3.5 Estudo epidemiológico dos grupos da amostra inicial

Para a obtenção dos dados epidemiológicos, os prontuários dos 87 pacientes com melanoma foram revisados e, sempre que necessário e possível, os pacientes foram contatados e convocados para entrevista.

Foram obtidas as informações que poderiam ter direta ou indiretamente influenciado no prognóstico destes pacientes. Estas observações constavam de:

1. sexo
2. idade ao diagnóstico
3. fototipo da pele de acordo com a classificação de Fitzpatrick: I a VI
4. localização do melanoma: cabeça/pescoço, tronco, membros ou extremidades
5. índice de Breslow
6. tipo histológico
7. presença de ulceração
8. pesquisa de linfonodo sentinela
9. desenvolvimento de metástases
10. situação atual do acompanhamento do paciente: livre de doença, vivo com doença, óbito por melanoma, óbito por outra causa e perda de seguimento.
Os pacientes que morreram ou fizeram o seguimento por um período menor que 7 meses contados a partir da data do diagnóstico foram considerados perdidos.
11. curva de sobrevida doença-específica realizada com dados obtidos dos pacientes até outubro de 2015, excetuando-se aqueles considerados perdidos.

3.6 Revisão das lâminas

As lâminas dos 89 casos de melanoma foram revisadas quanto ao diagnóstico, ao índice de Breslow e ao tipo de infiltrado linfocítico tumoral (ILT). Seguindo os critérios de Piris et al., 2012⁽¹¹⁾, o ILT foi classificado em uma das três categorias seguintes: ausente, *brisk* e não-*brisk*. Brevemente, o infiltrado é considerado ausente quando os linfócitos não estão infiltrando o tumor, estão completamente ausentes ou se dispõem ao redor de vasos, mas sem entrar em contato com o tumor. No outro extremo, o infiltrado *brisk*, termo este que ainda não tem uma tradução adequada para o Português, é aquele no qual o tumor está completamente permeado pelo infiltrado linfocítico, por vezes, até obscurecendo-o, ou quando está totalmente cercado pelos linfócitos, que formam uma barreira larga com 4 ou mais camadas de células no seu entorno. Já o infiltrado não-*brisk* apresenta linfócitos infiltrando o tumor em um ou vários focos, e/ou está restrito a 3 ou menos fileiras de células em torno de sua margem de avanço, situando-se a meio-termo entre as classificações ausente e *brisk*.

A seguir, foram feitas oito lâminas silanizadas em branco de cada bloco de parafina dos casos incluídos no estudo. Estas foram encaminhadas, então, aos laboratórios para os testes imunohistoquímicos.

3.7 Imunohistoquímica

3.7.1 Pesquisa Imunohistoquímica do antígeno NY-ESO-1

A pesquisa do antígeno NY-ESO-1 foi o primeiro teste imunohistoquímico realizado nos 89 casos e nos 20 nevos. O anticorpo monoclonal contra o NY-ESO-1,

mAB E978, desenvolvido em camundongos, foi gentilmente cedido pelo Instituto Ludwig. Os exames foram realizados no setor de imunohistoquímica do Laboratório Diagnóstika - Patologia Cirúrgica e Citologia, em São Paulo, Capital.

Foram testadas várias diluições do anticorpo anti-NY-ESO-1, de 1:50 até 1:3000, em dois tampões diferentes, citrato (pH = 6,0) e tris EDTA (pH = 9,0). O Dr. Roberto El Ibrahim, médico patologista responsável pelo laboratório em questão, definiu a diluição 1:1000 em tris-EDTA como sendo a mais adequada e confiável para a avaliação dos casos, reduzindo a possibilidade de falsos negativos. O controle positivo utilizado foi testículo humano (Figura 1).

Figura 1. Exame imunohistoquímico do antígeno NY-ESO-1 no testículo humano (controle positivo). A coloração acastanhada no citoplasma das células das glândulas tubulares de testículo humano revela a presença do antígeno NY-ESO-1. Microscopia óptica aumento de 200X ao fundo e de 400X no detalhe

O método utilizado foi o sistema de detecção por polímero - livre de biotina, que consiste nas seguintes etapas:

1. Desparafinização: as lâminas são desparafinizadas em duas baterias de xilol por 17 minutos cada, a temperatura ambiente (procedimento realizado dentro da capela).
2. Hidratação: consiste em banhar as amostras em sequência decrescente de etanol: etanol absoluto (três baterias), 95%, 80%, e 50%, por aproximadamente dois minutos cada (procedimento realizado dentro da capela); a seguir elas são lavadas em quatro banhos na água destilada, o que finaliza esta parte.
3. Recuperação antigênica: as lâminas são mergulhadas em solução tampão Tris- EDTA, pH: 9,0, e submetidas a um processo de calor úmido (panela Páscal – Dako) a temperatura de 125°C por 30 segundos; segue-se a lavagem das mesmas em quatro banhos na água destilada.
4. Bloqueio de peroxidase endógena: as lâminas são imersas em reagente de bloqueio de peroxidase endógena (50% de água oxigenada, 30 volumes, e 50% de metanol) por dez minutos (procedimento realizado dentro da capela); após segue-se a lavagem das lâminas com tampão PBS, pH: 7,55, por três vezes.
5. Bloqueio de proteínas inespecíficas: as lâminas ficam embebidas por dez minutos em solução Background Sniper (solução pronta para uso - Biocare Medical) e lavadas em um banho com tampão PBS, pH: 7,55.
6. Incubação com o anticorpo primário anti-NY-ESO 1: o anticorpo primário anti-NY-ESO-1 (Instituto Ludwig) é descongelado e diluído em solução de diluente de anticorpos (Dako) na proporção de 1:1000. Utiliza-se material de testículo humano como controle positivo da reação. É aplicado nas lâminas

um mínimo de 100 µl da solução do anticorpo. Elas são incubadas em câmara úmida por 12 horas (reação *overnight*) a temperatura ambiente.

7. Sistema de amplificação de sinal (MACH-4 - Biocare Medical), que é utilizado nas pesquisas com anticorpos de origem de coelho ou camundongo, como neste projeto. As lâminas são lavadas com tampão PBS, pH: 7,55, por três vezes, cinco minutos cada. O reagente MACH 4 mouse Probe é aplicado, num volume mínimo de 100 µl, e as amostras ficam em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente. A seguir, são lavadas com o tampão PBS, pH: 7,55, por três ocasiões, cinco minutos cada. O reagente MACH 4 HRP Polymer é colocado nas lâminas (no mínimo 100 µl) e incubado em câmara úmida por trinta minutos a temperatura ambiente. Novamente, na sequência, as lâminas são lavadas com tampão PBS, pH: 7,55, por três vezes, cinco minutos cada.
8. Revelação com cromógeno DAB (diaminobenzidina): as lâminas são lavadas com tampão PBS, pH: 7,55, por três vezes, cinco minutos cada. O cromógeno é preparado seguindo as recomendações do fabricante (1 ml de diluente + 1 gota de cromógeno, DAB - Biocare Medical) e aplicado nas lâminas, deixando-o por cinco minutos. As lâminas são novamente lavadas em água destilada, no mínimo por quatro vezes, três minutos cada.
9. Contra-coloração: as lâminas são mergulhadas em solução de hematoxilina de Harris por um minuto. A seguir, ocorre a lavagem em água destilada por quatro vezes. São passadas rapidamente em solução amoniacal (250ml de água + 10 gotas hidróxido de amônia) e lavadas em água destilada por três vezes.

10. Desidratação e diafanização (procedimento realizado dentro da capela): as lâminas são colocadas em sequência crescente de etanol: álcool 70%, 80%, 95% e 100% e diafanizadas em três banhos de xilol.
11. Montagem: as lâminas de imunohistoquímica, devidamente coradas, são montadas com meio de montagem (Bálsamo do Canadá diluído com xilol) e lamínula. A seguir, procede-se a identificação das lâminas, que se encontram prontas para a leitura.

3.7.2 Pesquisa Imunohistoquímica para células CD3+

A pesquisa de células CD3+ só pode ser realizada naqueles melanomas que apresentavam infiltrado linfocítico tumoral *brisk* ou *não-brisk*. Foram excluídos, portanto, os melanomas *in situ*, os melanomas em fase de crescimento radial e os casos em fase de crescimento vertical com ILT ausente. O teste para pesquisa de células CD3+ foi realizado no Massachusetts General Hospital, Departamento de Patologia, em Boston, nos Estados Unidos. Todas as etapas são as mesmas referidas acima, com a diferença de que foi feita de forma automatizada e não manualmente. O anticorpo utilizado na pesquisa foi o LN10 (Leica Bond Polymer Refined Detection Kit Cat# DS9800, Illinois, USA) e o cromógeno para revelação foi o vermelho permanente (Bond Polymer Red Detection Kit Cat# DS9390, Illinois, USA) (Figura 2). Usou-se tecido de amígdala para controle positivo.

Figura 2. Exame imunohistoquímico para células CD3+ em um caso de melanoma cutâneo primário. Note a coloração avermelhada na membrana celular dos linfócitos CD3+. Microscopia óptica aumento de 100X

3.7.3 Pesquisa imunohistoquímica para células CD8+FoxP3- , CD8-FoxP3+ e CD8+FoxP3+

A pesquisa de células CD8+FoxP3-, CD8-FoxP3+ e CD8+FoxP3+ só pode ser realizada naqueles melanomas que apresentavam infiltrado linfocítico tumoral. Foram excluídos, portanto, os melanomas *in situ*, os melanomas em fase de crescimento radial e os casos em fase de crescimento vertical com ILT ausente. A imunohistoquímica foi feita conforme descrito acima e o teste para pesquisa de CD8+ e FoxP3+ foi feito simultaneamente na mesma lâmina (dupla marcação), no Massachusetts General

Hospital, Thier Building, por Patrícia DellaPelle. Na marcação inicial para as células CD8+ usou-se o anticorpo SP16 (Biocare Medical, California, USA) e para FoxP3, o anticorpo FJK-16s (eBioscience, California, USA). O cromógeno vermelho permanente (DAKO, California, USA) foi usado para revelar as células CD8+ e o substrato azul (Vector Labs, California, USA) para revelar as células FoxP3+ (Figura 3). Usou-se tecido de amígdala humana para controle positivo.

Figura 3. Exame imunohistoquímico para células CD8+ e FoxP3+ em um caso de melanoma cutâneo primário. A coloração violácea destaca o receptor CD8 na membrana celular e a azul revela a proteína FoxP3+ no núcleo dos linfócitos. Eventualmente, uma célula se apresentava com ambas as marcações, distinguindo-se como um linfócito CD8+FoxP3+. Microscopia óptica sob aumento de 200X. No detalhe, sob aumento de 600X, a seta aponta para um linfócito CD8+FoxP3+ e a cabeça de seta indica uma célula FoxP3+

3.8 Interpretação das lâminas

3.8.1 NY-ESO-1

A leitura das lâminas da pesquisa de NY-ESO-1 (Figuras 4A e 4B) foi realizada por dois patologistas experientes em imunohistoquímica da pele, sem nenhuma informação prévia a respeito dos casos (MNS e LMD) e pela pesquisadora (MGB).

Os espécimes foram classificados quanto a:

- 1) intensidade (0 = negativo, 1= fraco, 2= moderado e 3 = intenso);
- 2) distribuição (completa, regional e salpicada)
- 3) porcentagem de células tumorais coradas (0 -100%)

Os critérios para que o melanoma fosse considerado positivo para NY-ESO-1 foram intensidade 2 ou 3 e porcentagem de células coradas no tumor >2%.

Figura 4. Exames imunohistoquímicos do antígeno NY-ESO-1 em casos de melanomas cutâneos primários. A) Distribuição regional com intensidade 3+ do antígeno NY-ESO-1 no citoplasma de parte das células tumorais. Microscopia óptica sob aumento de 400X; B) Distribuição completa com intensidade 3+ do antígeno NY-ESO-1 em quase a totalidade das células tumorais. Microscopia óptica sob aumento de 200X

3.8.2 Quantificação das células CD3+, CD8+FoxP3-, CD8-FoxP3+ e CD8+FoxP3+

Adaptamos o método da contagem pontual morfométrica, que foi previamente descrito para mastócitos por Kasper e Tharp, em 1987⁽⁷⁹⁾, e Duncan et al., em 1998⁽⁸⁰⁾. Em resumo, o método consiste em trocar-se uma ocular do microscópio por outra que contém uma lente gravada com uma grade medindo 10 x 10 mm, totalizando 100 quadradinhos contíguos. Cada intersecção entre 2 quadradinhos define um ponto individual. Se alguma parte da célula estudada ocupasse esse ponto de intersecção, esta seria contabilizada. Caso contrário, não haveria a contabilização (Figura 5). Isso foi feito sob magnificação de 400 vezes em 1 a 4 focos do tumor, dependendo da sua extensão e do seu infiltrado linfocítico tumoral. Quando o melanoma apresentou mais de 4 focos possíveis de serem contabilizados, aqueles com maior quantidade de infiltrado linfocítico tumoral foram escolhidos. Em cada foco contabilizado, obteve-se um número de células. Ao final de no máximo 4 focos, calculou-se a média de células para cada lâmina pesquisada e este número final foi usado para as análises estatísticas. Por exemplo, numa lâmina, 7 células CD3+ foram contabilizadas no primeiro foco, 21, no segundo e 14, no terceiro. A média utilizada para esta lâmina foi 14 $(7+21+14 \text{ dividido por } 3 = 14)$. Isso foi realizado para as células CD3+, CD8+FoxP3-, CD8-FoxP3+ e CD8+FoxP3+.

Unicamente para as células CD3+, classificou-se o tipo de arranjo que elas formavam na contagem pontual descrita acima. Cada célula contabilizada poderia estar isolada nesse ponto de intersecção, ou fazendo parte de pequenos grupos de 2 a 5 células, ou de grupos grandes com mais de 5 células. Assim, além do número final de células CD3+ em cada lâmina, foi analisado o tipo de arranjo (isolado, em pequenos grupos ou em grandes grupos) que elas apresentavam e em que porcentagem os

diferentes arranjos estavam presentes nos vários focos contabilizados. Assim como no realizado anteriormente, a porcentagem média de cada tipo de arranjo das células CD3+ foi estipulada somando-se a porcentagem obtida de cada arranjo em todos os focos e dividindo-se cada um deles pelo número total de focos contabilizados.

Figura 5. Ilustração da contagem das células CD3+, CD8+FoxP3-, CD8-FoxP3- e CD8+FoxP3+ no infiltrado linfocítico tumoral segundo o método da contagem pontual morfométrica. Para que a célula seja contabilizada, é necessário que alguma parte dela esteja na intersecção de 2 ou mais linhas da grade. Cada intersecção só pode ser ocupada por 1 célula por vez, portanto, mesmo que muitas células estejam aglomeradas em torno de uma intersecção, apenas 1 célula será contada naquele ponto

3.9 Estudo da associação do antígeno NY-ESO-1 e dados clínico-histopatológicos

Os casos de melanoma *in situ*, por apresentarem prognóstico muito diferente dos casos invasivos foram excluídos desta análise estatística. Os melanomas invasivos foram separados em dois grupos, positivo para NY-ESO-1 e negativo para NY-ESO-1, e comparados de acordo com os seguintes critérios:

1. sexo
2. idade ao diagnóstico
3. fototipo da pele de acordo com a classificação de Fitzpatrick: I a VI
4. localização do melanoma: cabeça/pescoço, tronco, membros ou extremidades
5. índice de Breslow
6. tipo histológico
7. presença de ulceração
8. pesquisa de linfonodo sentinela
9. desenvolvimento de metástases
10. situação atual do acompanhamento dos pacientes: livre de doença, vivo com doença, óbito por melanoma, óbito por outra causa e perda de seguimento
11. curva de sobrevida doença-específica
12. tipo de infiltrado linfocítico tumoral (ausente, *brisk* e não-*brisk*)
13. número de células CD3+
14. tipo de arranjo das células CD3+ (isolada, pequenos grupos ou grandes grupos)
15. número de células CD8+FoxP3-
16. número de células CD8-FoxP3+
17. número de células CD8+FoxP3+

Por fim, estas informações foram submetidas à análise estatística.

3.10 Análise Estatística

Para análise dos dados de idade, sexo, localização primária do tumor, fototipo, tipo histológico, ulceração, linfonodo sentinela, desenvolvimento de metástases e células CD3+, CD8+FoxP3-, CD8-FoxP3+, CD8+FoxP3+ na comparação dos grupos NY-ESO-1 positivo e negativo, utilizou-se o teste exato de Fischer. Para comparação do índice de Breslow e a positividade do NY-ESO-1, foi utilizado o teste t de Student. Para a comparação dos grupos quanto à evolução dos pacientes (livre de doença, vivo com doença, óbito por melanoma, óbito por outra causa e perda de seguimento), foi usado o teste ANOVA uma via. No caso da curva de sobrevida doença-específica, usou-se a curva de Kaplan-Meier e o teste de log-rank Mantel-Cox.

4 RESULTADOS

4.1 Dados Epidemiológicos da Amostra

Os resultados da pesquisa de todos os 87 pacientes totalizando 89 espécimes de melanoma estão compilados na Tabela 1 do Anexo. A seguir, as características da amostra do estudo serão descritas.

4.1.1 Caracterização dos pacientes

O melanoma foi mais diagnosticado nas mulheres, porém sem diferença estatisticamente significativa (Anexo, Tabela 1). Entretanto, nos homens, a doença foi mais grave, com taxa de mortalidade estatisticamente maior, conforme representada na Figura 1 do Anexo.

Em relação à idade ao diagnóstico, a amostra variou de 23 a 92 anos, com idade média de 59 anos. A maior parte dos pacientes foi diagnosticada entre 50 e 80 anos. Os fototipos II e III (classificação de Fitzpatrick) foram os mais prevalentes.

4.1.2 Caracterização dos melanomas

A localização mais frequente do tumor foi tronco, seguido pelos membros, cabeça/ pescoço e acral. Os tipos histológicos mais diagnosticados foram o extensivo superficial, seguido pelo nodular, lentigo maligno melanoma e acrolentiginoso.

A amostra foi constituída por 10 melanomas *in situ*, 11 em fase de crescimento radial e 68 em fase de crescimento vertical. A média do índice de Breslow foi 3,22 mm, considerando os 79 casos invasivos em que o Breslow foi medido, pois nos 10 casos *in situ* não é possível se obter este índice. O índice de Breslow >4,0 mm esteve associado ao aumento estatístico da mortalidade (Anexo, Figura 2). Nenhuma das lâminas de melanoma revisadas sofreu alteração na classificação inicial dos grupos.

Outro dado importante de morbi-mortalidade é a presença de ulceração no melanoma. A grande maioria dos casos do estudo (82%) não apresentava esta condição, como pode ser observado na Tabela 1 do Anexo.

A análise do infiltrado linfocítico tumoral revelou ausência de infiltrado em 19% (13/68), infiltrado não-*brisk* em 69% (47/68) e *brisk* em 12% (8/68). A pesquisa do linfonodo sentinela foi realizado em apenas 21% dos casos como mostra a Tabela 1 do Anexo, pois muitos pacientes não tinham indicação desta pesquisa ou o método ainda não era prática estabelecida por ocasião do diagnóstico.

No que tange o seguimento ambulatorial dos pacientes, excetuando-se aqueles com perda de seguimento (4%), a maioria deles se encontrava vivo até o término deste estudo (64%). O aparecimento de metástases no decorrer da doença é fator prognóstico ruim e foi constatado em 38% dos pacientes estudados, sendo que cerca de 50% destes acabaram por falecer de melanoma (Anexo, Tabela 1).

4.2 Resultados imunohistoquímicos

A pesquisa de NY-ESO-1 foi negativa em todos os nevos (0/20; Figura 6A) e 19% dos melanomas. Houve expressão em 10% (1/10; Figura 6B) dos melanomas *in situ*; em 0% dos melanomas em crescimento radial (0/11; Figura 6C); e em 24% dos

melanomas em crescimento vertical (16/68; Figura 6D). Como o melanoma *in situ* apresenta tratamento e prognóstico muito diferentes dos casos invasivos, todas as análises a seguir, testando associações com o antígeno NY-ESO-1, foram realizadas usando como amostra somente os melanomas invasivos, que eram 79 no total (em 78 pacientes).

Figura 6. Distribuição da expressão do antígeno NY-ESO-1 nos nevos melanocíticos, melanomas *in situ*, melanomas em crescimento radial e melanomas em crescimento vertical

Os parâmetros clínicos e histopatológicos dos grupos NY-ESO-1 positivos e negativos foram compilados na Tabela 1.

Tabela 1. Expressão de NY-ESO-1 no melanoma cutâneo primário invasivo segundo parâmetros clínicos e histopatológicos

Parâmetro	Subgrupo	Número de pacientes (%)	NY-ESO-1 Positivo N (%)	NY-ESO-1 Negativo N (%)
Sexo	Masculino	31 (40)	8 (26)	23 (74)
	Feminino	47 (60)	8 (17)	39 (83)
Fototipo de pele	I	1 (2)	0 (0)	1 (100)
	II	35 (56)	7 (20)	28 (80)
	III	22 (35)	5 (22)	17 (78)
	IV	4 (6)	2 (50)	2 (50)
	V	2 (3)	0 (0)	2 (100)
	VI	1 (2)	0 (0)	1 (100)
Média de idade (anos)		78	55.2	58.3
Localização	Membro	28 (35)	6 (21)	22 (79)
	Tronco	29 (37)	6 (21)	23 (79)
	Cabeça e pescoço	14 (18)	1 (7)	13 (93)
	Acral	8 (11)	3 (37.5)	5 (62.5)
Subtipo de Melanoma	Extensivo Superficial (1)	31 (39)	2 (6)	29 (94)
	Nodular	26 (33)	6 (23)	20 (77)
	Lentigo Maligna Melanoma	7 (9)	3 (43)	4 (57)
	Acrolentiginoso	8 (10)	3 (37.5)	5 (62.5)
	Inclassificável	7 (9)	2 (29)	5 (71)
Ulceração	Presente	16 (20)	5 (31)	11 (69)
	Ausente	63 (80)	11 (17)	52 (83)
Breslow(2)	≤ 1.0 mm	24 (30)	2 (8)	22 (92)
	1.01 – 4.0 mm	29 (37)	6 (21)	23 (79)
	> 4.0 mm	26 (33)	8 (31)	18 (69)
Linfonodo Sentinela	Positivo	2 (11)	0 (0)	2 (100)
	Negativo	16 (89)	4 (25)	12 (75)
Acompanhamento	Livre de doença	36(46)	9 (25)	27 (75)
	Vivo com metástase	16 (21)	1 (6)	15 (94)
	Falecido de melanoma	9 (12)	3 (33)	6 (67)
	Falecido por outra causa	14 (18)	1 (7)	13 (93)
	Perda do seguimento	3(4)	3 (100)	0 (0)

(1)p<0.02 para tipo extensivo superficial quando comparado aos outros tipos; (2) p não significativo para espessura entre os grupos, mas p = 0.017 quando a espessura média de todos os casos foi analisada.

4.2.1 Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo o sexo dos pacientes

O antígeno NY-ESO-1 foi detectado em 30% das mulheres e 26% dos homens, sem diferença estatística entre os sexos, conforme mostra a Figura 7.

Figura 7. Distribuição proporcional dos pacientes com melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o sexo

4.2.2 Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo a idade dos pacientes

A média de idade dos 78 pacientes com melanomas invasivos e positivos para NY-ESO-1 foi 55.2 anos, enquanto nos NY-ESO-1 negativos foi 58.3 anos. A diferença não foi estatisticamente significativa, conforme ilustra a Figura 8.

Figura 8. Distribuição dos pacientes com melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo a idade ao diagnóstico. As barras verticais representam a média de idade em anos e o desvio padrão nos grupos de melanomas NY-ESO-1 positivos (círculo cheio) e negativos (quadrado cheio)

4.2.3 Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo o fototipo dos pacientes

A maioria dos pacientes apresentou fototipo II ou III, expressando a proteína NY-ESO-1 em cerca de 20% dos casos. Nos pacientes tipos I (mais raro no Brasil) e nos tipos V e VI (menos afetados pelo melanoma) não encontramos nenhum caso positivo para NY-ESO-1. O teste estatístico não revelou diferença significativa entre os diferentes fototipos, conforme mostrado na Figura 9 abaixo.

Figura 9. Distribuição dos pacientes com melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o fototipo de pele (classificação de Fitzpatrick)

4.2.4 Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo a localização do melanoma

Os melanomas se localizaram mais frequentemente nos membros e no tronco, ambos com expressão de NY-ESO-1 em 21% dos casos. Não se observou diferença estatística entre os casos positivos e negativos em relação ao sítio primário do tumor (Figura 10).

Figura 10. Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo sua localização primária

4.2.5 Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo a evolução dos pacientes

A maioria dos pacientes, 46% (36/78), encontrava-se livre da doença ao final do tempo de acompanhamento, 20% (16/78) estavam vivos com metástases diagnosticadas, 12% (9/78) faleceram devido ao melanoma, 18% (14/78) faleceram de outras causas e 4% (3/78) perderam o acompanhamento, conforme Figura 11 abaixo. Não houve diferença estatística entre os grupos NY-ESO-1 positivo e negativo.

Figura 11. Distribuição dos pacientes com melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o seguimento ambulatorial

4.2.6 Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo a sobrevida doença-específica dos pacientes com melanoma

Não observamos diferença na sobrevida dos pacientes dos grupos NY-ESO-1 positivo ou negativo (vide gráfico a seguir).

Figura 12. Curva Kaplan-Meier de sobrevida doença-específica dos pacientes com melanoma segundo a expressão de NY-ESO-1 utilizando-se o teste de log-rank Mantel-Cox

4.2.7 Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo o infiltrado linfocítico tumoral (ILT)

Dentre os 68 casos de melanoma em crescimento vertical, verificamos a maior frequência de melanomas positivos para NY-ESO-1 nos que possuíam infiltrado não-*brisk* (30%), seguido de 13% nos infiltrado *brisk* e 8% naqueles com infiltrado ausente, conforme a ilustração abaixo da Figura 13. A diferença não foi significativa do ponto de vista estatístico.

Figura 13. Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o infiltrado linfocítico tumoral (ILT)

4.2.8 Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo o tipo histológico do melanoma

O tipo histológico mais frequente foi o extensivo superficial, porém foi o que teve menor positividade para NY-ESO-1. A diferença da expressão do NY-ESO-1 entre o subtipo extensivo superficial e os outros subtipos foi estatisticamente significativa ($p < 0,02$), conforme demonstrado no gráfico abaixo (Figura 14).

* $p < 0,02$ (extensivo superficial em comparação aos demais subtipos)

Figura 14. Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo tipo histológico

4.2.9 Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo a presença de ulceração no melanoma

A expressão do antígeno NY-ESO-1 foi proporcionalmente mais frequente nos melanomas ulcerados do que naqueles sem ulceração, porém, a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 15).

Figura 15. Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo a presença de ulceração

4.2.10 Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo o índice de Breslow

A distribuição categórica dos melanomas em grupos pelo índice de Breslow e a expressão do antígeno NY-ESO-1 pode ser vista na Figura 16 a seguir. A expressão do antígeno NY-ESO-1 aumenta com a espessura do melanoma, porém não houve diferença estatística ($p = 0,099$).

Figura 16. Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o índice de Breslow (variável categórica)

No entanto, na comparação entre os melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos usando-se a espessura como variável contínua, observa-se que a sua média nos tumores positivos é praticamente o dobro da média dos negativos, com significância estatística ($p = 0,007$), conforme apresentado na Figura 17 a seguir.

Figura 17. Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o índice de Breslow (variável contínua). Cada figura geométrica (quadrado ou triângulo) representa o índice de Breslow de um melanoma cutâneo primário invasivo estudado. A barra horizontal marca a espessura média de cada grupo, NY-ESO-1 positivo (NY POS) e NY-ESO-1 negativo (NY NEG)

4.2.11 Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo o *status* do linfonodo sentinela dos pacientes

Apenas 18 pacientes realizaram a pesquisa de linfonodo sentinela, sendo 2 deles positivos e 16 negativos. Dentre os casos com pesquisa negativa, quatro expressaram NY-ESO-1 no melanoma primário, como pode ser observado na Figura 18. Não houve associação estatística.

Figura 18. Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o status do linfonodo sentinela dos pacientes

4.3 Análise do antígeno NY-ESO-1 segundo parâmetros imunohistoquímicos

4.3.1 Análise da intensidade e distribuição do antígeno NY-ESO-1 no melanoma

Dentre os casos considerados positivos para NY-ESO-1, tivemos 63% (10/16) com 3+ de intensidade e 37% (6/16) com 2+ (Figura 19). O padrão de expressão do

NY-ESO-1 de distribuição regional foi o mais frequente (47%), seguido pelo completo (35%) e pelo salpicado (18%), como está exposto na Figura 20.

Figura 19. Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos segundo sua intensidade no melanoma

Figura 20. Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos segundo o padrão de expressão nas células tumorais do melanoma

4.3.2 Análise da porcentagem de células tumorais de melanoma expressando o antígeno NY-ESO-1

Em relação à porcentagem de células coradas pela reação de imunohistoquímica para o antígeno NY-ESO-1, observou-se a mesma taxa de casos expressando entre 2-20% das células e >60% das células, com 41% para cada grupo. Em apenas 18% dos tumores, houve uma expressão intermediária, entre 21-60%, como observado na Figura 21 abaixo.

Figura 21. Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos segundo a porcentagem de células tumorais expressando o antígeno

4.3.3 Análise das células CD3+, CD8+FoxP3-, CD8-FoxP3+, CD8+FoxP3+ segundo a expressão do antígeno NY-ESO-1 pelo melanoma

O número de células CD3+ foi, em média, menor nos tumores NY-ESO-1 positivos do que nos negativos, com significância estatística. Em relação às outras células, CD8+FoxP3-, CD8-FoxP3+ e as duplamente positivas para CD8+FoxP3+, não houve diferença entre as médias do número de células para tumores positivos ou negativos para NY-ESO-1, como demonstrado na Figura 22 abaixo.

Figura 22. Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo a pesquisa imunohistoquímica de células CD3+, CD8+FoxP3-, CD8-FoxP3+ e CD8+FoxP3+ no infiltrado linfocítico tumoral (variável contínua). Cada figura geométrica representa o número de células contabilizadas por mm² numa lâmina de melanoma cutâneo primário invasivo. A barra horizontal marca o número médio de células encontrado para cada subtipo de linfócitos

4.3.4 Análise do arranjo das células CD3+ segundo a expressão do antígeno NY-ESO-1 pelo melanoma

As células CD3+, além de estarem em menor número nos tumores positivos para NY-ESO-1, também se apresentavam num arranjo diferente. A maioria das células estava isolada ou em pequenos grupos de 2 a 5 células, enquanto nos melanomas NY-ESO-1 negativos as células se distribuíam preferencialmente em grandes grupos com 6 ou mais células. A Figura 23, a seguir, apresenta a porcentagem das células que se encontrava nos diferentes arranjos celulares.

Figura 23. Distribuição dos melanomas NY-ESO-1 positivos e negativos segundo o arranjo das células CD3+. Cada figura geométrica representa a porcentagem de células CD3+ contabilizadas numa lâmina de melanoma cutâneo primário invasivo. A barra horizontal marca a porcentagem média de células encontrada em cada tipo de arranjo de células (isoladas, pequenos grupos ou grandes grupos)

5 DISCUSSÃO

As características epidemiológicas dos pacientes analisados estão de acordo com as descritas na literatura brasileira e mundial, o que confere robustez ao estudo e torna a presente amostra representativa de uma população de pacientes com melanoma.

No presente estudo houve um maior número de mulheres diagnosticadas com melanoma, o que é concordante com uma casuística realizada em Criciúma, Santa Catarina⁽⁸¹⁾. Já as estimativas brasileiras do INCA⁽¹⁰⁾ para o ano de 2016 apontam para números bastante semelhantes de casos novos nos homens (3000) e nas mulheres (2670). Os dados da Grã-Bretanha mostram maior incidência nas mulheres atualmente, mas com tendência à igualdade entre os sexos até o ano de 2030⁽⁸²⁾. Diferentemente, nos Estados Unidos, os homens apresentam maior incidência da doença⁽⁹⁾. Ao relacionar-se o sexo com a gravidade do tumor, a presente pesquisa demonstrou maior mortalidade nos homens, com $p < 0,05$. Os dados do INCA e dos norte-americanos também indicam este mesmo comportamento⁽⁹⁾.

A média da idade dos pacientes estudados, 59 anos, foi maior que a publicada em dois artigos brasileiros, que relatam idade de 51 anos^(81, 83), porém muito próxima da média de idade dos norte-americanos, que é de 60 anos⁽⁸⁾. Quanto ao fototipo, observou-se que o melanoma foi mais frequente nos pacientes com fototipos II e III da classificação de Fitzpatrick, fato já esperado, uma vez que a doença é mais frequente nos indivíduos brancos, que correspondem aos fototipos mais baixos (I a IV). O menor número de indivíduos tipo I (ruivo) na população brasileira justifica o predomínio dos outros dois fototipos mais baixos, II e III.

O estudo revelou que o tronco foi o local mais acometido pelo melanoma,

superando os membros por uma pequena diferença, o que está em concordância com a literatura. O tipo extensivo superficial foi o mais frequente, seguido pelo nodular, dados estes similares à maioria dos artigos publicados no Ocidente^(81, 84).

A análise dos aspectos moleculares do melanoma tem tido cada vez maior importância para a compreensão dos seus vários subtipos, visando um tratamento mais específico para os diversos fenótipos e com um melhor desfecho. Em relação à análise do NY-ESO-1 nos tumores melanocíticos, não houve expressão deste antígeno em nenhum dos 20 nevos aqui analisados, fossem eles displásicos ou intradérmicos, corroborando com os resultados de um estudo anterior de Luft et al., em 2004⁽⁷⁰⁾, que analisou 19 nevos de tipos variados (Spitz, juncionais e compostos). Foi postulado pelos autores que o NY-ESO-1 poderia auxiliar no diagnóstico diferencial entre nevos benignos e melanomas. Estes achados também sugerem que o antígeno NY-ESO-1 poderia servir como alvo de tratamento do melanoma, embora um entendimento mais detalhado seja necessário para que essa estratégia terapêutica possa ser colocada em prática.

Somente um melanoma *in situ* expressou a proteína NY-ESO-1 (1/10) e os tumores em fase de crescimento radial foram todos negativos para o antígeno (0/11). A frequência do NY-ESO-1 nos melanomas em fase de crescimento vertical foi de 24% (16/68), sugerindo que o antígeno em questão esteja associado à progressão dos tumores melanocíticos. Não é possível, no entanto, determinar se a expressão do antígeno leva o melanoma a progredir ou se ao progredir o tumor passa a apresentar novos antígenos, entre eles, o NY-ESO-1.

Os 79 casos de melanomas invasivos foram analisados mais profundamente, excluindo-se os melanomas *in situ*, por estes apresentarem um prognóstico muito melhor que os invasivos e, em teoria, serem curáveis com a conduta padronizada atualmente de excisão e ampliação de margens. Os resultados obtidos com os testes para

o antígeno NY-ESO-1 foram concordantes em muitos aspectos com os dados de literatura. A positividade de 24% dos melanomas primários invasivos para o antígeno NY-ESO-1 é similar a estudos anteriores, que relataram frequências variando de 20 a 40% dos casos.

Goydos et al.⁽⁸⁵⁾ publicaram um estudo em 2001 no qual analisaram 52 melanomas, sendo 20 primários, 22 metástases locorregionais e 10 metástases à distância quanto à presença de NY-ESO-1 pelo método de PCR (total = 52). No geral, 33% (17/52) dos melanomas foram positivos para o antígeno, a maioria delas nas metástases locorregionais e à distância. No ano de 2006, Barrow e colaboradores⁽⁷²⁾ publicaram um estudo com 586 amostras de melanomas de 426 indivíduos, sem seleção prévia, e o teste imunohistoquímico foi positivo em 46% dos casos, independente do estágio da doença. Em 2007, Velasquez e colaboradores⁽⁷⁴⁾ encontraram 13% de positividade num estudo com 61 melanomas primários e 32% em 63 melanomas metastáticos, usando o teste imunohistoquímico. Uma pesquisa australiana⁽⁷⁵⁾ com 321 pacientes identificou a proteína NY-ESO-1 em 37% dos melanomas cutâneos em estádios I e II utilizando a técnica de imunohistoquímica para sua detecção. As diferenças na frequência do NY-ESO-1 entre os achados dos diferentes estudos podem se dever não só ao estágio do melanoma (primário X metastático), mas também ao método empregado (PCR X imunohistoquímica) e ao cut-off utilizado para se considerar o tumor como sendo positivo ou negativo.

Quanto à distribuição do antígeno nas células tumorais do melanoma, não há concordância entre os trabalhos da literatura. Barrow et al., em 2006⁽⁷²⁾, verificaram que o padrão completo era o mais raro e o regional, o mais comum nos tumores primários. Velasquez et al., em 2007⁽⁷⁴⁾, encontraram 50% de distribuição salpicada, 13% regional e 37% de completa dentre os melanomas NY-ESO-1 positivos. O presente estudo obteve

47% de distribuição regional, 35% de completa e 18% de salpicada. Isso demonstra que a expressão do antígeno NY-ESO-1 é bastante heterogênea entre os pacientes, num mesmo paciente em diferentes estádios (primário X metástase) e até dentro de uma mesma amostra tumoral. Não está claro porque isso ocorre, mas uma explicação plausível seria o fato de que a expressão do antígeno pode se dar somente a partir de uma determinada fase do tumor ou pode ser interrompida também em um dado momento, o que poderia explicar esses padrões tão díspares de distribuição.

A porcentagem de células do melanoma que expressaram NY-ESO-1 também variou grandemente na amostra estudada. Foi obtido um número igual de casos (41%) expressando a proteína numa porcentagem pequena (2 a 20%) e numa porcentagem alta (>60%) de células tumorais, e apenas 18% dos tumores apresentaram uma porcentagem intermediária entre 21-60%. Tal fato corrobora ainda mais a observação acima da heterogenicidade da expressão do NY-ESO-1 nos melanomas primários da pele.

Não houve associação significativa do NY-ESO-1 com o sexo do paciente, com a idade ao diagnóstico do melanoma primário, com o fototipo da pele e nem com o local de surgimento do tumor, em concordância com estudo australiano recente⁽⁷⁵⁾, único a tentar correlacionar essas variáveis. Na análise do tipo histológico, o tipo extensivo superficial esteve associado negativamente com a presença do NY-ESO-1, quando comparado aos outros tipo histológicos em conjunto ($p < 0,02$), o que não havia sido relatado anteriormente na literatura. Svobodova et al.⁽⁷¹⁾, em 2011 não havia encontra associação entre esses duas variáveis. O conhecimento emergente de diferenças genômicas entre os subtipos de melanomas, com o tipo extensivo superficial mais frequentemente abrigando a mutação de BRAF V600E em comparação com os outros subtipos de melanoma, é interessante no contexto dos achados do presente estudo.

Houve associação entre o índice de Breslow e a expressão do NY-ESO-1 nos melanomas invasivos primários da pele ($p = 0,007$). Outros resultados similares foram publicados. Um deles avaliou 251 melanomas primários e mostrou aumento da expressão do NY-ESO-1 no grupo intermediário entre 1,1-4,0 mm de espessura quando comparado aos mais finos, menores que 1,1 mm⁽⁷²⁾. Em outro trabalho, examinando 61 melanomas primários da pele, a espessura média dos tumores positivos foi 4,7 mm versus 1,53 mm nos negativos⁽⁷⁴⁾. Mais recentemente, em 2011, uma pesquisa com 321 melanomas apresentou maior expressão do antígeno NY-ESO-1 com o aumento da espessura do melanoma⁽⁷¹⁾.

Ao analisarmos a presença de ulceração no tumor em relação à positividade da proteína NY-ESO-1, evidenciamos uma tendência à associação positiva, porém não houve significância estatística. Isso talvez seja explicado pelo pequeno número de tumores ulcerados na nossa amostra. O mesmo resultado foi obtido no estudo australiano⁽⁷⁵⁾. O número de mitoses no melanoma não foi analisado neste trabalho porque os pacientes participantes foram diagnosticados antes do ano de 2009, quando a AJCC passou a considerar este critério como um dos fatores prognósticos importantes no melanoma cutâneo primário. Assim sendo, os laudos anátomo-patológicos dos casos utilizados no estudo não continham esta informação para que ela pudesse ser analisada estatisticamente.

Apesar das pesquisas indicarem que a presença do NY-ESO-1 está associada a tumores mais espessos, e estes serem mais frequentemente causadores de metástases, nosso trabalho não evidenciou diferença estatística no *status* do linfonodo sentinela nem no desenvolvimento de metástases dos pacientes em relação à presença do antígeno, porém o pequeno número de casos com linfonodo sentinela avaliados pode ter prejudicado a análise.

Quanto à sobrevida doença-específica dos pacientes, a maioria dos estudos associou a presença da expressão dos antígenos câncer-testis com um prognóstico pior numa variedade de cânceres, como neuroblastoma⁽⁸⁶⁾, câncer de ovário⁽⁸⁷⁾, câncer de mama⁽⁸⁸⁾, mieloma múltiplo⁽⁸⁹⁾ e outros. Nos melanomas, alguns trabalhos demonstraram a mesma associação^(72, 74, 85), mas o estudo australiano⁽⁷⁵⁾ não observou diferença estatística entre os grupos. Nossa pesquisa também não evidenciou diferença estatística na sobrevida entre os pacientes dos dois grupos comparados.

Está claro que a expressão da proteína NY-ESO-1 não está associada independentemente com o prognóstico, e que o microambiente imunológico tumoral é um fator determinante na progressão e evolução da doença. Recentemente um estudo concluiu que o ILT de alto grau (*brisk*) no melanoma primário está associado a um menor risco de morte, independente das características tumorais que são correntemente usadas pela AJCC (American Joint Committee on Cancer)⁽⁹⁰⁾. Em outros trabalhos, a presença do ILT no melanoma conferiu melhor prognóstico aos pacientes⁽²⁴⁾. Nós analisamos o tipo de infiltrado linfocítico tumoral nos melanomas em fase de crescimento vertical e se haveria alguma associação com a presença de NY-ESO-1. Os tumores com ILT não-*brisk* foram os que mais comumente apresentaram NY-ESO-1 (14/47); seguidos dos tumores com ILT *brisk* (1/13) e, por fim, com ILT ausente (1/8). Outro estudo também reportou uma associação heterogênea entre o tipo de ILT e 77 melanomas positivos para NY-ESO-1: 57% tinham ILT ausente, 38%, não-*brisk* e 5%, *brisk*. Ambos os estudos mostram que a expressão tumoral de NY-ESO-1 não garante necessariamente uma resposta imune efetiva, o que talvez contribua para a ausência de correlação com a sobrevida dos pacientes.

Analisamos também a resposta imune local no tumor primário e a presença de NY-ESO-1. Os resultados mostraram uma associação negativa entre o antígeno e a

presença de células CD3+ no ILT ($p = 0,017$). Nos melanomas NY-ESO-1 positivos, não só havia um menor número de células CD3+ no ILT, mas elas se encontravam isoladas ($p = 0,009$) ou em pequenos grupos de 2 a 5 células ($p = 0,0125$), contrastando com os tumores NY-ESO-1 negativos, que apresentavam arranjos com grandes grupos de 6 ou mais células CD3+ no infiltrado ($p = 0,0001$). Não encontramos pesquisas publicadas sobre o microambiente tumoral e o antígeno NY-ESO-1. Ao contrário do que esperávamos, a presença do antígeno não resultou num maior influxo de linfócitos CD3+ no tumor.

Diversos artigos mostraram associação de células CD8+FoxP3- no ILT com um melhor prognóstico^(26, 33, 91). As células CD8-FoxP3+ não apresentaram correlação com a sobrevida na literatura^(33, 92), enquanto que a razão CD8+/FoxP3+ sim, mas foi analisada em um pequeno número de casos somente⁽³³⁾. Nosso estudo não encontrou associação entre o número de células CD8+FoxP3-, CD8-FoxP3+ e CD8+FoxP3+ (duplamente positivas) no ILT e a expressão de NY-ESO-1 nos melanomas.

Marcadores imunológicos, como a presença de células T circulantes específicas para o antígeno NY-ESO-1 podem ser úteis como índice prognóstico dos pacientes a longo prazo e também servir no monitoramento da resposta a imunoterápicos⁽⁷⁶⁾. Estudos *in vitro* revelaram que há regressão do tumor associada à imunidade específica contra o NY-ESO-1, que se correlacionou com um melhor prognóstico para os pacientes em estudos clínicos realizados^(45, 47-49, 51, 93). Há ensaios clínicos terapêuticos em andamento usando células T CD4+ autólogas modificadas geneticamente contra NY-ESO-1⁽⁷⁷⁾ e vacinas feitas com CHP e NY-ESO-1⁽⁶⁴⁾, ou usando vetores de fowlpox expressando NY-ESO-1⁽⁶³⁾.

Em suma, o antígeno NY-ESO-1 não está presente em nevos e é quase invariavelmente ausente em melanomas *in situ* e naqueles em fase de crescimento

radial. Nos melanomas em fase de crescimento vertical, esteve presente em 24 % das vezes, associando-se com a espessura do tumor. Todos esses achados sugerem que ele seja um indicador de progressão nos tumores melanocíticos. O NY-ESO-1 esteve inversamente associado ao tipo histológico extensivo superficial, o que talvez demonstre que determinadas alterações genômicas facilitam ou dificultam a sua expressão. Apesar de ser uma proteína imunogênica, o NY-ESO-1 foi associado a um menor número de células CD3+, que se arranjavam no infiltrado linfocítico tumoral em pequenos grupos ou de forma isolada, diferentemente dos melanomas que não apresentavam o antígeno. Essa constatação necessita ser melhor elucidada, mas mostra que outros fatores do microambiente tumoral são importantes na orquestração da resposta imune contra o tumor, o que estimula mais estudos a respeito da função do NY-ESO-1 e sua influência nos pacientes portadores de melanoma.

6 CONCLUSÕES

O teste imunohistoquímico com o anticorpo NY-ESO-1 foi negativo em todos os nevos e melanomas em fase de crescimento radial; foi positivo em apenas 10% dos melanomas *in situ*; e em melanomas em fase de crescimento vertical foi expresso em cerca de 24% dos casos. Esses dados sugerem que o antígeno NY-ESO-1 pode ser um marcador de progressão dos tumores melanocíticos.

A expressão da proteína NY-ESO-1 nos melanomas primários é bastante heterogênea: pode ser regional, salpicada ou completa; acometer uma pequena porcentagem das células tumorais ou quase 100% delas; e apresentar intensidade variável.

A positividade do NY-ESO-1 esteve associada a melanomas mais espessos, mas não à presença de ulceração no tumor, *status* do linfonodo sentinela e a parâmetros clínicos, como o desenvolvimento de metástase ou sobrevida do paciente.

O NY-ESO-1 se associou negativamente ao tipo histológico extensivo superficial em relação aos outros subtipos e os melanomas NY-ESO-1 positivos apresentaram menor número de células CD3+ no infiltrado linfocítico tumoral do que o grupo negativo. O arranjo das células CD3+ também mostrou-se significativamente diferente entre os grupos de tumores positivos e negativos. Os primeiros apresentavam células CD3+ isoladas ou em pequenos grupos de até 5 células enquanto que nos últimos, elas se dispunham em arranjos contendo 6 ou mais células CD3+ no infiltrado linfocítico tumoral. Estes achados inéditos e instigantes permitem compreender melhor a função deste antígeno câncer-testis no melanoma e estimula novas pesquisas para buscarmos melhores abordagens para o paciente com esta doença.

7 ANEXOS

Anexo, Tabela 1. Parâmetros clínicos e histopatológicos da amostragem geral dos pacientes com melanoma primário cutâneo

Parâmetro	Subgrupo	Número de pacientes (%)
Gênero	Masculino	37 (43)
	Feminino	50 (57)
Fototipo da Pele	I	1 (1)
	II	40 (46)
	III	24 (28)
	IV	4 (5)
	V	2 (2)
	VI	1 (1)
	Não classificado	15 (17)
Idade média (anos)	59	87 (100)
Localização	Membro	30 (34)
	Tronco	30 (34)
	Cabeça e Pescoço	19 (21)
	Acral	10 (11)
Tipo Histológico do Melanoma	Extensivo Superficial	35 (39)
	Nodular	26 (29)
	Lentigo Maligno	11 (13)
	Acrolentiginoso	10 (11)
	Não Classificado	7 (8)
Ulceração	Presente	16 (18)
	Ausente	73 (82)
Índice de Breslow	≤ 1.0 mm	34 (38)
	1.01 – 2.0 mm	29 (33)
	> 4.0 mm	26 (29)
Linfonodo Sentinela	Positivo	2 (11)
	Negativo	16 (89)
Acompanhamento	Livre de doença	38 (44)
	Vivo com metástase	16 (18)
	Falecido de melanoma	16 (18)
	Falecido de outra causa	14 (16)
	Perdido	3 (4)

Anexo, Figura 1. Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos pacientes com melanoma primário cutâneo de acordo com o gênero ($p = 0,0353$; teste log-rank Mantel-Cox)

Anexo, Figura 2. Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos pacientes com melanoma primário cutâneo segundo índice de Breslow ($\leq 4,0$ mm ou $> 4,0$ mm; $p = 0,0468$; teste log-rank Mantel-Cox)

8 REFERÊNCIAS

1. WHO. Mortality and morbidity in cancer http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en2015 [Available from: [who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en](http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en)].
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*. 2007;57(1):43-66.
3. Baxevas CN, Perez SA, Papamichail M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58(3):317-24.
4. Fitzpatrick T, Eisen A, Wolff K, Freedberg I, Austin K. *Dermatology in General Medicine* Estados Unidos: McGraw-Hill; 1993 [
5. Linos E, Swetter SM, Cockburn MG, Colditz GA, Clarke CA. Increasing burden of melanoma in the United States. *J Invest Dermatol*. 2009;129(7):1666-74.
6. Armstrong BK, Krickler A. Cutaneous melanoma. *Cancer Surv*. 1994;19-20:219-40.
7. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008;58(2):71-96.
8. CDC. Center of Control Disease <http://www.apps.nccd.cdc.gov/uscs/toptencancers.aspx>: CDC; 2015 [Available from: <http://www.apps.nccd.cdc.gov/uscs/toptencancers.aspx>].
9. SEER. <http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html2015> [
10. INCA. Câncer, Pele Melanoma http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma_2016 [Available from: http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma].
11. Piris A, Lobo AC, Duncan LM. Melanoma staging: where are we now? *Dermatol Clin*. 2012;30(4):581-92, v.
12. Neuman HB, Patel A, Ishill N, Hanlon C, Brady MS, Halpern AC, et al. A single-institution validation of the AJCC staging system for stage IV melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(7):2034-41.
13. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6199-206.

14. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2001;19(16):3635-48.
15. Shen J, Lei QQ, Chen X, Cao C, Cen Y. Diagnostic performance of microphthalmia transcription factor for melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(6):798-805.
16. Flammiger A, Besch R, Cook AL, Maier T, Sturm RA, Berking C. SOX9 and SOX10 but not BRN2 are required for nestin expression in human melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 2009;129(4):945-53.
17. Keilholz U, Punt CJ, Gore M, Kruit W, Patel P, Lienard D, et al. Dacarbazine, cisplatin, and interferon-alfa-2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: a randomized phase III trial (18951) of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. *J Clin Oncol*. 2005;23(27):6747-55.
18. Weber JS, Hamid O, Chasalow SD, Wu DY, Parker SM, Galbraith S, et al. Ipilimumab increases activated T cells and enhances humoral immunity in patients with advanced melanoma. *J Immunother*. 2012;35(1):89-97.
19. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(9):809-19.
20. Raval RR, Sharabi AB, Walker AJ, Drake CG, Sharma P. Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *J Immunother Cancer*. 2014;2:14.
21. Romero P, Dunbar PR, Valmori D, Pittet M, Ogg GS, Rimoldi D, et al. Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1998;188(9):1641-50.
22. Haanen JB, Baars A, Gomez R, Weder P, Smits M, de Gruijl TD, et al. Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55(4):451-8.
23. Anichini A, Molla A, Vegetti C, Bersani I, Zappasodi R, Arienti F, et al. Tumor-reactive CD8+ early effector T cells identified at tumor site in primary and metastatic melanoma. *Cancer Res*. 2010;70(21):8378-87.
24. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, Moncrieff M, Murali R, McCarthy SW, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2012;30(21):2678-83.

25. Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996;77(7):1303-10.
26. van Houdt IS, Sluijter BJ, Moesbergen LM, Vos WM, de Gruijl TD, Molenkamp BG, et al. Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *Int J Cancer*. 2008;123(3):609-15.
27. Tuthill RJ, Unger JM, Liu PY, Flaherty LE, Sondak VK, Group SO. Risk assessment in localized primary cutaneous melanoma: a Southwest Oncology Group study evaluating nine factors and a test of the Clark logistic regression prediction model. *Am J Clin Pathol*. 2002;118(4):504-11.
28. Mihm MC, Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest*. 1996;74(1):43-7.
29. Hillen F, Baeten CI, van de Winkel A, Creyten D, van der Schaft DW, Winnepeninckx V, et al. Leukocyte infiltration and tumor cell plasticity are parameters of aggressiveness in primary cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(1):97-106.
30. Mandalà M, Imberti GL, Piazzalunga D, Belfiglio M, Labianca R, Barberis M, et al. Clinical and histopathological risk factors to predict sentinel lymph node positivity, disease-free and overall survival in clinical stages I-II AJCC skin melanoma: outcome analysis from a single-institution prospectively collected database. *Eur J Cancer*. 2009;45(14):2537-45.
31. Bogunovic D, O'Neill DW, Belitskaya-Levy I, Vacic V, Yu YL, Adams S, et al. Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(48):20429-34.
32. Burton AL, Roach BA, Mays MP, Chen AF, Ginter BA, Vierling AM, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in melanoma. *Am Surg*. 2011;77(2):188-92.
33. Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011;105(1):93-103.
34. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci O, Gure AO, Tsang S, et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(5):1914-8.
35. Türeci O, Sahin U, Schobert I, Koslowski M, Scmitt H, Schild HJ, et al. The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res*. 1996;56(20):4766-72.

-
36. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(8):615-25.
 37. Juretic A, Spagnoli GC, Schultz-Thater E, Sarcevic B. Cancer/testis tumour-associated antigens: immunohistochemical detection with monoclonal antibodies. *Lancet Oncol*. 2003;4(2):104-9.
 38. immunity C. <http://www.cancerimmunity.org/CTdatabase2015> [
 39. Marchand M, Weynants P, Rankin E, Arienti F, Belli F, Parmiani G, et al. Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int J Cancer*. 1995;63(6):883-5.
 40. Thurner B, Haendle I, Röder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, et al. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med*. 1999;190(11):1669-78.
 41. Bettinotti MP, Panelli MC, Ruppe E, Mocellin S, Phan GQ, White DE, et al. Clinical and immunological evaluation of patients with metastatic melanoma undergoing immunization with the HLA-Cw*0702-associated epitope MAGE-A12:170-178. *Int J Cancer*. 2003;105(2):210-6.
 42. Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jäger D, et al. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med*. 1998;187(2):265-70.
 43. Gnjatich S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Güre AO, Ritter G, Jäger E, et al. NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv Cancer Res*. 2006;95:1-30.
 44. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res*. 2004;10(15):5094-100.
 45. Fujita S, Wada H, Jungbluth AA, Sato S, Nakata T, Noguchi Y, et al. NY-ESO-1 expression and immunogenicity in esophageal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(19):6551-8.
 46. Peng JR, Chen HS, Mou DC, Cao J, Cong X, Qin LL, et al. Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Lett*. 2005;219(2):223-32.
 47. Wang Y, Wu XJ, Zhao AL, Yuan YH, Chen YT, Jungbluth AA, et al. Cancer/testis antigen expression and autologous humoral immunity to NY-ESO-1 in gastric cancer. *Cancer Immun*. 2004;4:11.
 48. Nakada T, Noguchi Y, Satoh S, Ono T, Saika T, Kurashige T, et al. NY-ESO-1 mRNA expression and immunogenicity in advanced prostate cancer. *Cancer Immun*. 2003;3:10.

49. Odunsi K, Jungbluth AA, Stockert E, Qian F, Gnjjatic S, Tammela J, et al. NY-ESO-1 and LAGE-1 cancer-testis antigens are potential targets for immunotherapy in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 2003;63(18):6076-83.
50. Kurashige T, Noguchi Y, Saika T, Ono T, Nagata Y, Jungbluth A, et al. Ny-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade. *Cancer Res.* 2001;61(12):4671-4.
51. Jungbluth AA, Antonescu CR, Busam KJ, Iversen K, Kolb D, Coplan K, et al. Monophasic and biphasic synovial sarcomas abundantly express cancer/testis antigen NY-ESO-1 but not MAGE-A1 or CT7. *Int J Cancer.* 2001;94(2):252-6.
52. Hemminger JA, Ewart Toland A, Scharschmidt TJ, Mayerson JL, Kraybill WG, Guttridge DC, et al. The cancer-testis antigen NY-ESO-1 is highly expressed in myxoid and round cell subset of liposarcomas. *Mod Pathol.* 2013;26(2):282-8.
53. Mashino K, Sadanaga N, Tanaka F, Yamaguchi H, Nagashima H, Inoue H, et al. Expression of multiple cancer-testis antigen genes in gastrointestinal and breast carcinomas. *Br J Cancer.* 2001;85(5):713-20.
54. Kubuschok B, Xie X, Jesnowski R, Preuss KD, Romeike BF, Neumann F, et al. Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int J Cancer.* 2004;109(4):568-75.
55. Yin B, Zeng Y, Wang X, Liu G, Zhang M, Song Y. Expression and clinical significance of cancer-testis genes in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(7):4112-9.
56. Inaoka RJ, Jungbluth AA, Gnjjatic S, Ritter E, Hanson NC, Frosina D, et al. Cancer/testis antigens expression and autologous serological response in a set of Brazilian non-Hodgkin's lymphoma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(12):2207-14.
57. Stockert E, Jäger E, Chen YT, Scanlan MJ, Gout I, Karbach J, et al. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med.* 1998;187(8):1349-54.
58. van Rhee F, Szmania SM, Zhan F, Gupta SK, Pomtree M, Lin P, et al. NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood.* 2005;105(10):3939-44.
59. Jäger E, Nagata Y, Gnjjatic S, Wada H, Stockert E, Karbach J, et al. Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(9):4760-5.
60. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature.* 1998;392(6671):86-9.
61. Nagata Y, Ono S, Matsuo M, Gnjjatic S, Valmori D, Ritter G, et al. Differential presentation of a soluble exogenous tumor antigen, NY-ESO-1, by distinct human dendritic cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(16):10629-34.

-
62. Jäger E, Stockert E, Zidianakis Z, Chen YT, Karbach J, Jäger D, et al. Humoral immune responses of cancer patients against "Cancer-Testis" antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events. *Int J Cancer*. 1999;84(5):506-10.
 63. Odunsi K, Matsuzaki J, Karbach J, Neumann A, Mhawech-Fauceglia P, Miller A, et al. Efficacy of vaccination with recombinant vaccinia and fowlpox vectors expressing NY-ESO-1 antigen in ovarian cancer and melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(15):5797-802.
 64. Uenaka A, Wada H, Isobe M, Saika T, Tsuji K, Sato E, et al. T cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein. *Cancer Immun*. 2007;7:9.
 65. Kawabata R, Wada H, Isobe M, Saika T, Sato S, Uenaka A, et al. Antibody response against NY-ESO-1 in CHP-NY-ESO-1 vaccinated patients. *Int J Cancer*. 2007;120(10):2178-84.
 66. Maraskovsky E, Sjölander S, Drane DP, Schnurr M, Le TT, Mateo L, et al. NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX adjuvant is a potent anticancer vaccine inducing both humoral and CD8+ t-cell-mediated immunity and protection against NY-ESO-1+ tumors. *Clin Cancer Res*. 2004;10(8):2879-90.
 67. Chen Q, Jackson H, Parente P, Luke T, Rizkalla M, Tai TY, et al. Immunodominant CD4+ responses identified in a patient vaccinated with full-length NY-ESO-1 formulated with ISCOMATRIX adjuvant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(25):9363-8.
 68. Davis ID, Chen W, Jackson H, Parente P, Shackleton M, Hopkins W, et al. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(29):10697-702.
 69. Old LJ. Cancer vaccines: an overview. *Cancer Immun*. 2008;8 Suppl 1:1.
 70. Lüftl M, Schuler G, Jungbluth AA. Melanoma or not? Cancer testis antigens may help. *Br J Dermatol*. 2004;151(6):1213-8.
 71. Vaughan HA, Svobodova S, Macgregor D, Sturrock S, Jungbluth AA, Browning J, et al. Immunohistochemical and molecular analysis of human melanomas for expression of the human cancer-testis antigens NY-ESO-1 and LAGE-1. *Clin Cancer Res*. 2004;10(24):8396-404.
 72. Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, et al. Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res*. 2006;12(3 Pt 1):764-71.
 73. Bolli M, Schultz-Thater E, Zajac P, Guller U, Feder C, Sanguedolce F, et al. NY-ESO-1/LAGE-1 coexpression with MAGE-A cancer/testis antigens: a tissue microarray study. *Int J Cancer*. 2005;115(6):960-6.

-
74. Velazquez EF, Jungbluth AA, Yancovitz M, Gnjjatic S, Adams S, O'Neill D, et al. Expression of the cancer/testis antigen NY-ESO-1 in primary and metastatic malignant melanoma (MM)--correlation with prognostic factors. *Cancer Immun.* 2007;7:11.
 75. Svobodová S, Browning J, MacGregor D, Pollara G, Scolyer RA, Murali R, et al. Cancer-testis antigen expression in primary cutaneous melanoma has independent prognostic value comparable to that of Breslow thickness, ulceration and mitotic rate. *Eur J Cancer.* 2011;47(3):460-9.
 76. Weide B, Zelba H, Derhovanessian E, Pflugfelder A, Eigentler TK, Di Giacomo AM, et al. Functional T cells targeting NY-ESO-1 or Melan-A are predictive for survival of patients with distant melanoma metastasis. *J Clin Oncol.* 2012;30(15):1835-41.
 77. Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med.* 2008;358(25):2698-703.
 78. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol.* 2011;29(7):917-24.
 79. Kasper CS, Tharp MD. Quantification of cutaneous mast cells using morphometric point counting and a conjugated avidin stain. *J Am Acad Dermatol.* 1987;16(2 Pt 1):326-31.
 80. Duncan LM, Richards LA, Mihm MC. Increased mast cell density in invasive melanoma. *J Cutan Pathol.* 1998;25(1):11-5.
 81. Konrad P, Fabris MR, Melao S, Blanco LF. Histopathological and epidemiological profile of cases of primary cutaneous melanoma diagnosed in Criciúma-SC between 2005 and 2007. *An Bras Dermatol.* 2011;86(3):457-61.
 82. Mistry M, Parkin DM, Ahmad AS, Sasieni P. Cancer incidence in the United Kingdom: projections to the year 2030. *Br J Cancer.* 2011;105(11):1795-803.
 83. Luiz OC, Gianini RJ, Gonçalves FT, Francisco G, Festa-Neto C, Sanches JA, et al. Ethnicity and cutaneous melanoma in the city of Sao Paulo, Brazil: a case-control study. *PLoS One.* 2012;7(4):e36348.
 84. Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24(5):879-97.
 85. Goydos JS, Patel M, Shih W. NY-ESO-1 and CTp11 expression may correlate with stage of progression in melanoma. *J Surg Res.* 2001;98(2):76-80.

-
86. Oberthuer A, Hero B, Spitz R, Berthold F, Fischer M. The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome. *Clin Cancer Res*. 2004;10(13):4307-13.
 87. Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, Mazareb S, Spagnoli GC, Resnick MB. Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin Cancer Res*. 2003;9(17):6453-60.
 88. Krüger S, Ola V, Feller AC, Fischer D, Friedrich M. Expression of cancer-testis antigen CT7 (MAGE-C1) in breast cancer: an immunohistochemical study with emphasis on prognostic utility. *Pathol Oncol Res*. 2007;13(2):91-6.
 89. Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, et al. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun*. 2008;8:2.
 90. Thomas NE, Busam KJ, From L, Krickler A, Armstrong BK, Anton-Culver H, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. *J Clin Oncol*. 2013;31(33):4252-9.
 91. Piras F, Colombari R, Minerba L, Murtas D, Floris C, Maxia C, et al. The predictive value of CD8, CD4, CD68, and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. *Cancer*. 2005;104(6):1246-54.
 92. Ma MW, Medicherla RC, Qian M, Vega-Saenz de Miera E, Friedman EB, Berman RS, et al. Immune response in melanoma: an in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymph node. *Mod Pathol*. 2012;25(7):1000-10.
 93. Chitale DA, Jungbluth AA, Marshall DS, Leitao MM, Hedvat CV, Kolb D, et al. Expression of cancer-testis antigens in endometrial carcinomas using a tissue microarray. *Mod Pathol*. 2005;18(1):119-26.