Miguel Angel Zúñiga Castillo

**Expressão do antígeno leucocitário humano G,
interleucina 10 e macrófagos M2
no melanoma lentiginoso acral**

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

Programa de Dermatologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mirian Nacagami Sotto

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Zúñiga Castillo, Miguel Angel

Expressão do antígeno leucocitário humano G, interleucina 10 e macrófagos M2 no melanoma lentiginoso acral / Miguel Angel Zúñiga Castillo. -- São Paulo, 2017.

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

Orientador: Mirian Nacagami Sotto.

Descritores: 1.Melanoma 2.Evasão tumoral 3.Antígenos HLA-G
4.Interleucina-10 5.Macrófagos 6.Imuno-histoquímica

USP/FM/DBD-034/17

DEDICATÓRIA

A minha esposa Gabriela por ter me incentivado a realizar o doutorado, por ter me apoiado em todo momento, pela sua ternura e amor incomensurável.

Aos meus pais por ter me criado com amor e carinho, por ter me dado todos os valores e as ferramentas essenciais para o meu desenvolvimento na vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, a Professora Mirian Nacagami Sotto com quem aprendi arte e ciência, por ter me guiado durante todo o desenvolvimento do doutorado, por sua paciência, compreensão, carinho e preocupação, por sua generosidade com seus conhecimentos e experiência, por ter me ensinado disciplina e a caminhar na dermatopatologia.

AGRADECIMENTOS

A Professora Neusa Yuriko Sakai Valente por todo o tempo de convivência comigo durante meu trabalho de tese no HC-FMUSP, por todos os seus conselhos, por compartilhar sua sabedoria comigo, por ter me ensinado valores, a amar a dermatologia e a dermatopatologia, e por ter me entregado seu carinho maternal.

Ao Professor José Antônio Sanches Junior a quem admiro e respeito como pessoa, por seus grandes conhecimentos que transmite generosamente com a humildade e a calma de um sábio, pela sua empatia, compreensão e apoio.

A Professora Ilana Halpern por ter sempre acreditado em mim, por ter me entregado desinteressadamente o máximo dos seus conhecimentos, por ter me incentivado a seguir os caminhos da dermatopatologia, pela sua amizade e carinho.

A Naiura, Flavia e Fernanda por seu importante suporte técnico, por sua boa vontade e simpatia.

A Jaqueline, Cristina, Luciana e Antônio por ter me ajudado enormemente do ponto de vista técnico e por sua excelente disposição e alegria.

A minha família chilena e brasileira, e aos meus amigos por todo seu grande apoio e carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado, do Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG), processo 15223-12-4.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, processo 4729101/2010-8.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. 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, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de siglas	x
Lista de símbolos	xii
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xiv
Resumo	xvi
Abstract	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Gerais	5
2.2 Específicos	5
3. REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 Melanoma lentiginoso acral	8
3.2 Fatores prognósticos no melanoma cutâneo de acordo com o “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) 8ª edição de 2017	12
3.3 Antígeno leucocitário humano G	16
3.4 Interleucina 10.....	19
3.5 Macrófagos M2	21
4. MÉTODOS	24
4.1 Seleção da casuística	25
4.2 Critérios de exclusão	26
4.3 Aspectos éticos	26
4.4 Técnicas de imuno-histoquímica	26

4.5 Captura e análise de imagens	30
4.6 Análise morfométrica do antígeno leucocitário humano G e interleucina 10	31
4.7 Análise morfométrica de células com expressão das moléculas CD163 e CD206	31
4.8 Análise estatística	32
5. RESULTADOS	34
5.1 Expressão do antígeno leucocitário humano G	37
5.2 Expressão da interleucina 10	39
5.3 Macrófagos M2 imunomarcados por CD163 e CD206	41
5.4 Análise estatística	43
5.4.1 Antígeno leucocitário humano G	43
5.4.2 Interleucina 10.....	43
5.4.3 Macrófagos M2 imunomarcados com os anticorpos CD163 e CD206	50
6. DISCUSSÃO	67
6.1 Melanoma lentiginoso acral	68
6.2 Antígeno leucocitário humano G	70
6.2.1 Antígeno leucocitário humano G e espessura do tumor	71
6.2.2 Antígeno leucocitário humano G, ulceração e mitose	71
6.2.3 Antígeno leucocitário humano G e metástase	72
6.3 Interleucina 10	73
6.3.1 Interleucina 10 e espessura do melanoma	73
6.3.2 Interleucina 10, ulceração e mitose	74
6.3.3 Interleucina 10 e metástase	74

6.4 Antígeno leucocitário humano G e interleucina 10 na progressão/invasão tumoral e ulceração dos grupos de melanoma lentiginoso acral e de melanoma extensivo superficial	75
6.5 Macrófagos M2 imunomarcados pelos anticorpos CD163 e CD206 no microambiente de melanoma	76
6.5.1 <i>Macrófagos M2 no microambiente tumoral, espessura, ulceração e mitose</i>	77
6.5.2 <i>Macrófagos M2 no microambiente tumoral e metástase</i>	79
6.6 Análise conjunta dos fatores regulatórios dependentes das células neoplásicas e do microambiente tumoral possivelmente implicados no comportamento biológico do melanoma lentiginoso acral	80
7. CONCLUSÕES	83
8. ANEXOS	86
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE SIGLAS

- AJCC: "American Joint Committee on Cancer"
- BSA: "bovine serum albumin" - soroalbumina bovina.
- CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa.
- APCs: "antigen presenting cells" - células apresentadoras de antígeno.
- CD: células dendríticas.
- CD: "cluster of differentiation" - grupo de diferenciação.
- EUA: Estados Unidos da América
- PDGF: "platelet-derived growth factor" - fator de crescimento derivado de plaquetas.
- Fr: frequência.
- HIF1: "hypoxia inducible factor-1" - fator induzível por hipóxia 1
- HLA-G: "human leukocyte antigen-G" - antígeno leucocitário humano G.
- IL-10: "interleukin-10" – interleucina 10.
- IFN- γ : "interferon gamma" – interferon gama.
- OMC: outros melanomas cutâneos.
- M-CSF: "macrophages colony-stimulating fator" - fator estimulante de colônia de macrófagos
- MES: melanoma extensivo superficial.
- MESs: melanomas extensivos superficiais.

- MHC: “major histocompatibility complex” - complexo principal de histocompatibilidade.
- MLA: melanoma lentiginoso acral.
- MLAs: melanomas lentiginosos acrais.
- MM1: macrófagos M1
- MM2: macrófagos M2.
- MMII: membros inferiores.
- MMSS: membros superiores.
- NK: “natural killers” - exterminadoras naturais.
- PBS: “phosphate buffered saline” - solução salina tamponada com fosfatos.
- TAM: “tumor associated macrophages” – macrófagos associados ao tumor.
- TAP: “transporter associated with antigen processing” – transportador associado com o processamento antigênico.
- TGF- β : “transforming growth factor beta” - fator de crescimento transformador beta.
- Th: “T helper” - T auxiliar.
- Tis: tumor *in situ*.
- TNF- α : “tumor necrosis factor alpha” - fator de necrose tumoral alfa
- VEGF: “vascular endothelial growth factor” – fator de crescimento do endotélio vascular.

LISTA DE SÍMBOLOS

- %: porcentagem.
- °C: graus Celsius.
- >: maior que
- ≤: menor ou igual
- mm: milímetro.
- mm²: milímetro quadrado.
- pH: potencial hidrogeniônico.
- μm: micrometro.
- σ: desvio padrão.

LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1.** Técnica imuno-histoquímica com anticorpo anti - antígeno leucocitário humano G em melanoma lentiginoso acral e no melanoma extensivo superficial38
- **Figura 2.** Técnica de imuno-histoquímica com anticorpo anti - interleucina 10 em melanoma lentiginoso acral e no melanoma extensivo superficial40
- **Figura 3.** Técnica imuno-histoquímica com os anticorpos anti - CD163 e CD206 em melanoma lentiginoso acral e no melanoma extensivo superficial42
- **Figura 4.** Expressão do antígeno leucocitário humano G e interleucina 10 em melanoma lentiginoso acral e no melanoma extensivo superficial45
- **Figura 5.** Expressão do antígeno leucocitário humano G no melanoma lentiginoso acral e melanoma extensivo superficial de acordo com a espessura, ulceração, mitoses/mm² e associação com metástase46
- **Figura 6.** Expressão da interleucina 10 no melanoma lentiginoso acral e melanoma extensivo superficial de acordo com a espessura, ulceração, mitoses/mm² e associação com metástase47
- **Figura 7.** Curva ROC para sensibilidade e especificidade da variável número de macrófagos CD206+ (células/mm²) no infiltrado intratumoral em relação ao evento presença de metástases.66

LISTA DE TABELAS

- **Tabela 1.** Anticorpos, clones, códigos, marcas, diluição e sistema de detecção29
- **Tabela 2.** Dados clínicos e histopatológicos de doentes com melanoma lentiginoso acral e melanoma extensivo superficial36
- **Tabela 3.** Correlação da expressão do antígeno leucocitário humano G e interleucina 10 no melanoma lentiginoso acral e extensivo superficial. Teste de correlação de Pearson49
- **Tabela 4.** Macrófagos M2 (células/mm²) imunomarcados com os anticorpos CD163 e CD206 no melanoma lentiginoso acral e extensivo superficial51
- **Tabela 5.** Macrófagos M2 (células/mm²) imunomarcados com os anticorpos CD163 e CD206 no melanoma lentiginoso acral e extensivo superficial, de acordo com a espessura do tumor53
- **Tabela 6.** Macrófagos M2 (células/mm²) imunomarcados com os anticorpos CD163 e CD206 no melanoma lentiginoso acral e extensivo superficial não ulcerados e ulcerados56
- **Tabela 7.** Macrófagos M2 (células/mm²) imunomarcados com os anticorpos CD163 e CD206 no melanoma lentiginoso acral e extensivo superficial e atividade mitótica58
- **Tabela 8.** Macrófagos M2 (células/mm²) imunomarcados com os anticorpos CD163 e CD206 no melanoma lentiginoso acral e extensivo superficial e associação com metástase60

- **Tabela 9.** Correlação de Pearson entre os marcadores CD163 e CD206 no microambiente do melanoma lentiginoso acral e no melanoma extensivo superficial62
- **Tabela 10.** Regressão logística binária para as variáveis metástase e número de macrófagos CD206+ (células/mm²) no infiltrado intratumoral64

RESUMO

RESUMO

Zúñiga Castillo, MA. *Expressão do antígeno leucocitário humano G, interleucina 10 e macrófagos M2 no melanoma lentiginoso acral*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: O melanoma lentiginoso acral (MLA) é um subtipo pouco frequente do melanoma cutâneo que geralmente apresenta evolução desfavorável e agressiva. Os mecanismos patogénéticos relacionados a essa evolução clínica não são totalmente conhecidos. Atualmente, estudos da literatura enfocam os mecanismos de evasão imunológica relacionados ao microambiente do melanoma, uma vez que os mesmos podem inibir a resposta imune antitumoral permitindo a progressão da doença. A expressão do Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G) e da Interleucina 10 (IL-10) e os macrófagos M2 (MM2) do microambiente tumoral são estratégias de evasão imune desenvolvidas por algumas neoplasias. Esses fatores, entretanto, não têm sido estudados especificamente no MLA. **OBJETIVOS:** Com o propósito de verificar se a expressão tumoral do HLA-G, IL-10 e a população de MM2 no microambiente tumoral estão relacionados com as características histopatológicas preditivas de pior comportamento biológico do melanoma e o evento de metástase, fez-se a comparação desses marcadores e de MM2 entre grupos de MLA e de melanoma extensivo superficial (MES). **MÉTODOS:** A casuística estudada compreendeu 67 espécimes de MLAs e 67 de MESs. Os tumores foram classificados de acordo com sua espessura, ulceração, presença de mitoses e associação com metástases. Fez-se a demonstração da expressão do HLA-G, IL-10 e de MM2 (CD163+ e CD206+) por técnica de imuno-histoquímica. A expressão (fração de área tumoral imunomarcada) do HLA-G e IL-10, assim como o

número de MM2 por unidade de área do microambiente intra e peritumoral foram comparados entre os grupos de tumores classificados como acima mencionado, utilizando-se os testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon. Verificou-se a correlação entre os marcadores HLA-G e IL-10 e entre CD163 e CD206 pelo teste de correlação de Pearson. Fez-se um modelo de regressão logística binária no qual foram incluídas inicialmente todas as variáveis do estudo e sua interação com o evento presença de metástase. **RESULTADOS:** A expressão do HLA-G e IL-10 tumoral, assim como o número de MM2 da região intra e peritumoral dos espécimes de MLA foi maior que nos de MES ($p < 0,05$). Houve correlação positiva entre a expressão do HLA-G e IL-10, assim como entre o número de MM2 marcados por CD163 e CD206. No modelo de regressão logística binária, a variável número de macrófagos imunomarcados pelo anticorpo CD206 da região intratumoral mostrou-se significativa e relacionada com o evento metástase. **CONCLUSÕES:** As moléculas imunorreguladoras HLA-G e IL-10 expressas pelas células neoplásicas, assim como o número elevado de MM2 do microambiente tumoral devem ser considerados fatores envolvidos no comportamento biológico mais agressivo do MLA.

Descritores: 1. Melanoma 2. Evasão tumoral 3. Antígenos HLA-G 4. Interleucina-10
5. Macrófagos 6. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

ABSTRACT

Zúñiga Castillo, MA. *Expression of human leukocyte antigen-G, Interleukin-10 and M2-macrophages in acral lentiginous melanoma*. [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

BACKGROUND: Acral lentiginous melanoma (ALM) is an uncommon cutaneous tumor that usually has an aggressive behavior and results in an unfavorable prognosis. The pathogenic mechanism related to the clinical evolution remains unknown. Currently, evasion mechanisms related to the melanoma microenvironment, which can inhibit the anti-tumor immune response allowing disease progression, are the focus of numerous studies. The expression of human leukocyte antigen-G (HLA-G), Interleukin-10 (IL-10) and M2-Macrophages (MM2) at the tumor site represents one of these immunosuppressive strategies developed for some neoplasms. However, those factors have not been studied specifically in ALM. **OBJECTIVES:** In order to verify if HLA-G and IL-10 tumoral expression as well as MM2 population in the melanoma microenvironment are related to the histopathological features predictive of unfavorable prognosis in melanoma and metastasis, we compared those markers and cells between ALM and superficial spreading melanoma (SSM) groups. **METHODS:** We analyzed 67 ALM and 67 SSM cases. The tumors were classified in groups according thickness, ulceration, mitosis and metastasis. HLA-G, IL-10 and MM2 (CD163+ and CD206+) expression were evaluated using immunohistochemistry. The expression (tumoral positive area fraction) of HLA-G and IL-10, as well as the number of MM2 in the intratumoral and peritumoral area was compared between the groups of melanomas using Kruskal-Wallis and Wilcoxon’s tests. The Pearson’s test was used to establish the

correlation between HLA-G and IL-10, as well as between CD163 and CD206. Also, a binary logistic regression model was used to analyze all variables in relation to metastasis. **RESULTS:** HLA-G and IL-10 tumoral expression as well as the number of MM2 in the intratumoral and peritumoral area was increased in ALM compared with SSM ($p < 0.05$). There was positive correlation between HLA-G and IL-10 tumoral expression, as well as between the number of MM2 marked by CD163 and CD206. In the binary logistic regression model, the MM2 CD206⁺ of the intratumoral area was significantly associated with metastasis. **CONCLUSIONS:** The HLA-G and IL-10 melanoma expression likewise the high number of MM2 in the tumoral microenvironment must be considered as features associated with the increased aggressiveness of the ALM.

Descriptors: 1. Melanoma 2. Tumor Escape 3. HLA-G Antigens 4. Interleukin-10
5. Macrophages 6. Immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os melanomas cutâneos representam aproximadamente 78% de todas as mortes por câncer de pele (1). Nos Estados Unidos da América (EUA) a sua incidência tem aumentado aproximadamente 3% ao ano nas últimas décadas (2), ocupando o 6º e o 7º lugar entre os cânceres mais comumente diagnosticados em homens e mulheres respectivamente (1, 3).

O melanoma lentiginoso acral (MLA) é um tumor cutâneo raro (4, 5), sua incidência nos EUA é 1,8 casos por milhão de habitantes por ano (6), sendo o menos comum dos quatro subtipos principais de melanoma na população caucasiana, a qual apresenta uma maior incidência de melanoma (1, 7-9). Nestes pacientes o MLA representa 4%-10% de todos os diagnósticos de melanoma (9). Por outro lado, o MLA é o subtipo de melanoma mais comum em indivíduos de pele mais escura ou amarela (asiáticos, do Oriente Médio, hispano-americanos e africanos), os quais têm uma menor incidência de melanoma (1, 5, 9, 10). Nesta população o MLA representa 58% a 70% dos casos de melanoma (5, 10, 11).

Os fatores de risco e patogênese do MLA ainda são desconhecidos (12). É sugerido, na literatura, que o trauma intenso e crônico na pele dos sítios acrais poderia ser um fator predisponente (4, 5, 9). Os pacientes com MLA geralmente têm um prognóstico ruim, em parte porque estes procuram atendimento médico com a doença em uma fase mais avançada e muitas vezes já com metástases regionais (1, 5, 7, 12-14). Também há várias razões que poderiam explicar este fenômeno, incluindo o comportamento biológico agressivo inerente do MLA ligado a predisposição genética, a dificuldade na identificação e diagnóstico precoce de lesões acrais, as quais são áreas tipicamente cobertas, bem como o estado geral de saúde desses pacientes, que são

geralmente pessoas mais idosas do que outros pacientes com melanoma (7, 9, 14). No entanto, ainda são desconhecidos os fatores patogênicos que explicam a agressividade característica deste tumor.

Atualmente, os mecanismos de evasão do melanoma que podem inibir a resposta imune antitumoral, permitindo a progressão da doença, são o foco de muitos estudos (15). A expressão no microambiente tumoral do Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G), da Interleucina 10 (IL-10) e da população de macrófagos M2 (MM2) são estratégias de evasão imune desenvolvidas por alguns tumores, as quais não têm sido estudadas especificamente em casuística representativa ou grande de MLA.

Considerando o acima exposto, nos propusemos os objetivos a seguir.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Comparar a expressão do HLA-G, IL-10 e da população de MM2 de um grupo de MLA com um grupo de melanoma extensivo superficial (MES), a fim de verificar se esses fatores estão relacionados com as características histopatológicas relacionadas ao pior comportamento biológico do melanoma e a associação com metástase.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão do HLA-G e IL-10 pelas células tumorais do MLA de acordo com a espessura (*in situ*; $\leq 1,0$ mm e $> 1,0$ mm) dos tumores, presença ou ausência de ulceração, mitoses/mm² e associação com metástase.

- Comparar a expressão do HLA-G e IL-10 pelas células tumorais do MLA com a de grupo pareado de MES, de acordo com as características histopatológicas relacionadas ao prognóstico e associação com metástases.

- Avaliar o número de MM2 na região intratumoral e peritumoral da resposta tecidual do MLA, de acordo com a espessura (*in situ*; $\leq 1,0$ mm e $> 1,0$ mm) dos tumores, presença ou ausência de ulceração, mitoses/mm² e associação com metástases.

- Comparar o número de MM2 na região intratumoral e peritumoral da resposta tecidual do MLA com a de grupo pareado de MES, de acordo com as características histopatológicas relacionadas ao prognóstico e associação com metástases.

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Melanoma lentiginoso acral

O MLA foi descrito pela primeira vez por *Reed* em 1976 (16). É um subtipo de melanoma localizado nas palmas, plantas, região subungual e pele glabra do dorso de mãos e pés. Exibe uma fase de crescimento radial lentiginosa durante meses ou anos até desenvolver uma etapa invasiva (17, 18). Os melanócitos atípicos tumorais intraepidérmicos comumente apresentam morfologia dendrítica, mas podem também ser epiteloïdes. Os melanócitos neoplásicos proliferam como células individuais ou formando ninhos, os quais podem exibir ascensão pagetoide e se estender aos anexos por contiguidade. Ao invadir a derme formam ninhos ou cordões, mantendo a sua mesma morfologia ou ocasionalmente adquirem aspecto fusiforme associado a estroma desmoplásico (8, 19).

Posteriormente foram também incluídos como MLAs as lesões histológicamente características (uma vez que todos os tipos de melanoma podem se apresentar em regiões acrais), localizadas desde o punho ou tornozelo incluindo todas as regiões do aparato ungueal (5, 14, 17, 20).

Portanto, para o correto diagnóstico a lesão deve apresentar duas características essenciais: estar localizada nas regiões acrais acima descritas e apresentar proliferação lentiginosa de melanócitos atípicos ao longo da junção dermo-epidérmica, com ou sem invasão da derme (21).

O MLA apresenta-se frequentemente em indivíduos idosos, de pele escura ou amarela, que exibem poucos ou nenhum nevo melanocítico e com uma baixa frequência de queimaduras solares comparado a pacientes com MESs (22).

Do ponto de vista clínico, a lesão usualmente se apresenta como uma mácula ou pápula pigmentada, de bordas irregulares e com discromia. Durante sua evolução a lesão pode crescer em diâmetro e espessura e se transformar em um nódulo exofítico com áreas pigmentadas, com ou sem ulceração. As lesões amelanóticas também são comuns, apresentando-se como máculas, pápulas ou nódulos de cor rósea (22). As lesões ungueais apresentam-se como estrias pigmentadas, que frequentemente estendem-se à prega ungueal proximal (sinal de Hutchinson). Os MLAs da região ungueal também podem ser amelanóticos. As lesões do aparelho ungueal podem evoluir com espessamento e ulceração (10).

Frequentemente o MLA pode ser clinicamente diagnosticado como úlceras crônicas traumáticas que não cicatrizam, corpos estranhos, granulomas piogênicos, verrugas, micoses e hematomas, sendo muitas vezes tratados por anos por um diagnóstico equivocado até que a lesão adquira exuberância clínica que motiva a realização da biopsia para exame anatomopatológico (19, 22).

Existem evidências de que o MLA tem etiologia, patogênese, fatores de risco e história natural diferente do MES (2), que é o subtipo de melanoma mais comum na população geral (1). A genética influencia a patogênese e progressão dos diferentes subtipos de melanoma e em parte, por esta razão tem-se buscado classificar os subtipos histológicos de acordo ao seu perfil genético. O MES possui mutações de *NRAS* em 17% dos casos e um grande número tem mutações de *BRAF* (50%). Além disso, dos casos que apresentam mutações em *BRAF* muitos deles também apresentam mutações do *PTEN*.

Os MLAs têm uma frequência similar de mutações de *NRAS* semelhante a descrita para o MES (15%). Entretanto, apresentam baixa frequência de mutações de *BRAF* (17%) e raramente têm mutações do *PTEN*. Além disso, o MLA apresenta comumente mutações ativantes ou amplificações do *KIT* (15 a 40%) (22).

Ciclina D1 é uma proteína envolvida no “checkpoint” de G1/S no ciclo celular e foi estudada por Sauter *et al.* em melanomas acrais (23). Esses autores encontraram uma superexpressão do gene da ciclina D1 nos melanomas acrais (44,4%) quando comparados ao MES (5,6%). O tipo histológico dos melanomas acrais desse estudo não foi especificado (23), não obstante, é amplamente conhecido que a imensa maioria dos melanomas acrais são MLAs (24). Em outro estudo, Ibrahim *et al.* encontraram uma expressão de ciclina D1 em 68% dos melanomas acrais comparado a 33% dos melanomas não acrais (25).

Bradford *et al.*, realizaram o maior estudo epidemiológico sobre MLA nos EUA, com 1.413 casos de MLAs e 88.885 casos de outros subtipos de melanomas cutâneos (OMC). Esse estudo demonstrou que o MLA tem um pior prognóstico ou menor sobrevida, quando comparado com o grupo controle que englobava todos os OMC. A taxa de sobrevida global de 5 e 10 anos no grupo de OMC foi de 91,3% e 87,5% respectivamente, enquanto a sobrevida do grupo MLA de 5 e 10 anos foi de 80,3% e 67,5% respectivamente ($p < 0,05$). Os autores desse estudo também encontraram diferenças estatisticamente significativas na sobrevida de 10 anos dos OMC com Breslow $\leq 1,0$ mm e daqueles com espessura de 2,01 a 4,00 mm (95,4% e 62% respectivamente), quando comparada com o grupo MLA (87,8% e 43,5% respectivamente). Essa diferença na sobrevida de 10 anos se manteve na comparação entre o grupo OMC em estádios II e III (78,5% e 56,6% respectivamente) com o grupo MLA (68,2% e 40,9% respectivamente) (1).

Outra pesquisa realizada no Japão evidenciou diferença estatisticamente significativa na sobrevida de 10 anos de 385 pacientes com MES (80%) comparado com a de 841 pacientes com MLA (70,5%) (26). Em estudo de Taiwan verificou-se que o risco de morte de pacientes com MLA é cerca de 6,7 vezes maior que o de MES ($p < 0,05$) (11).

O mau prognóstico do MLA poderia ser atribuído ao atraso no diagnóstico devido às dificuldades na detecção de lesões em zonas cobertas ou de difícil acesso para a visualização. Outros fatores considerados são a demora na procura de consulta por razões socioeconômicas ou educacionais dos pacientes, por erro diagnóstico e também pelo fato de serem pacientes com baixa frequência de nevos atípicos que motive um seguimento de “screening” por parte de dermatologistas. Todos esses fatores, poderiam justificar que a confirmação diagnóstica do MLA ocorra nos seus estádios avançados, muitas vezes inclusive com metástases (19, 22). Além de todos esses fatores, a maior incidência do MLA em pacientes idosos poderia agregar comorbidades que podem influenciar o curso prognóstico dos pacientes (22).

Entretanto, permanece a dúvida se o comportamento biológico ruim do MLA seria somente devido ao seu diagnóstico tardio ou se este subtipo clínico-patológico de melanoma apresenta características próprias ou relacionadas ao seu microambiente tumoral que podem estar vinculadas ao seu mau comportamento biológico (1).

3.2 Fatores prognósticos no melanoma cutâneo de acordo com o “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) 8ª edição de 2017 (2).

A procura de diferentes parâmetros histopatológicos e marcadores biológicos, que possam ser úteis como fatores prognósticos ou de estadiamento no melanoma, tem sido tema de grande interesse pela comunidade científica.

A 8ª edição do "American Joint Committee on Cancer" (AJCC) de 2017 resume os fatores prognósticos mais importantes para o melanoma cutâneo, os quais são mencionados a seguir.

A espessura (índice de Breslow) dos melanomas invasivos permanece como o mais importante fator prognóstico e de estadiamento no exame anatomopatológico do melanoma primário. O índice de Breslow correlaciona-se estreitamente com o risco de metástase (2). Balch *et al.* demonstraram que dependendo da espessura da lesão, a sobrevida de 10 anos de pacientes com melanomas cutâneos é: de 92% nos T1 ($\leq 1,00$ mm de espessura), 80% nos T2 (1,01 a 2,00 mm de espessura), 63% nos T3 (2,01 a 4,00 mm de espessura) e de 50% nos T4 ($>4,00$ mm de espessura) (27). O nível de invasão de Clark é também um fator prognóstico independente, mas em comparação com o índice de Breslow exibe menor acurácia e menor correlação com sobrevida (2).

A ulceração no melanoma está relacionada com o volume e taxa de proliferação tumoral, uma vez que a epiderme sofre necrose provocada pelo rápido crescimento do tumor e a consequente interrupção do fluxo sanguíneo (8). Este indicador é um importante fator prognóstico e tem correlação com o risco de metástase (2). Além disso, a sobrevida de pacientes com melanomas ulcerados é proporcionalmente mais baixa que a daqueles pacientes com melanomas não ulcerados na mesma categoria T de espessura tumoral, sendo semelhante quanto à sobrevida dos

pacientes com melanomas não ulcerados da categoria T seguinte de espessura do tumor (27). A ulceração permanece como um fator prognóstico dominante no estadiamento clínico (cTNM) da AJCC 8^{ed} nas etapas I e II, ou seja, quando não são detectadas metástases locorregionais ou à distância (2).

A atividade mitótica é um potente fator prognóstico e preditor de sobrevida independente no melanoma (2, 27). O índice mitótico foi retirado como critério para o estadiamento TNM da AJCC 8^{ed}, não porque tenha deixado de ser um importante fator prognóstico, mas pelo fato que a categoria T1, subestratificada como T1a (espessura <0,8 mm) e T1b (espessura entre 0,8 a 1,0 mm), exibiu associação mais forte no modelo preditivo do que o critério de mitose. Entretanto, os autores desse consenso declaram que provavelmente a mitose será um importante parâmetro a ser usado no desenvolvimento de futuros modelos prognósticos. Desse modo, recomendam continuar informando nos laudos histopatológicos o número de mitoses/mm² (2).

A mitose reflete a atividade proliferativa do melanoma (8) e na medida que seu número aumenta, independente da espessura tumoral, diminui progressivamente a probabilidade de sobrevida. Assim, a sobrevida em 10 anos: com 0 mitose/mm² é de 93,2%, com pelo menos 1 mitose/mm² é de 84,2% e assim progressivamente até chegar a ≥ 20 mitoses/mm² com somente 47,6% de sobrevida (28). Mitose é considerada a mais importante preditora independente de sobrevida depois da espessura do tumor e supera em importância a presença de ulceração (27, 28). Assim, se o melanoma apresenta qualquer evidência de atividade mitótica (ou seja ≥ 1 por mm²), o prognóstico do paciente é pior comparado com o de tumor sem mitoses. Por outro lado, também nos tumores com estadiamento T1, a mitose correlaciona-se com linfonodo sentinela positivo para metástase (28).

Podemos observar do acima exposto que as variáveis espessura, ulceração e mitose estão relacionadas entre si e traduzem a agressividade biológica do melanoma (8, 28), cuja máxima expressão é a produção de metástase e, por último, a morte.

O melanoma tem como primeira via de disseminação o sistema linfático, sendo a invasão dos vasos linfáticos uma incipiente expressão desta capacidade, que é considerada um preditor independente de metástase e de mau prognóstico (2, 29).

A doença metastática locorregional não nodal é definida como um contínuo entre a microsateletose (metástase microscópica cutânea e/ou subcutânea, adjacente ou em profundidade ao melanoma primário, separada deste por tecido normal), a sateletose clínica (metástase cutânea ou subcutânea clinicamente detectada dentro dos 2 cm adjacentes ao melanoma primário) e a metástase em trânsito (metástase cutânea ou subcutânea clinicamente detectada distando 2 cm do melanoma primário na via de drenagem do primeiro escalão linfonodal). A doença metastática locorregional não nodal é consequência da disseminação linfática, ou também possivelmente angiotrópica, sendo as suas três formas indicadores preditivos semelhantes de mau prognóstico que, categorizam o paciente no cTNM como Nc, ou seja, o paciente inicia seu estadiamento na etapa III (2).

A doença metastática locorregional nodal é caracterizada pelas metástases clinicamente ocultas (detectadas através do linfonodo sentinela) ou clinicamente evidentes. Ambas outorgam um mau prognóstico, porém a metástase nodal clinicamente evidente tem ainda pior prognóstico, que se acentua com o do número de linfonodos comprometidos. No linfonodo as células metastáticas do melanoma, isoladas ou em agrupamentos, habitualmente proliferam na região subcapsular e, com o crescimento tumoral, comprometem a região parenquimatosa ganglionar linfática. A metástase pode se estender através da cápsula até o tecido adiposo perinodal, o que

caracteriza a extensão extracapsular ou extranodal que são parâmetros prognósticos adversos. A carga de células tumorais no linfonodo sentinela tem sido objeto de estudo. A presença de poucas células metastáticas na região subcapsular (considerado metástase nodal) tem probabilidade extremamente baixa de se associar com metástase em outros linfonodos quando da linfadenectomia regional. Em contraste, a presença de grandes ninhos tumorais que comprometem o parênquima ou ainda mais a região extracapsular, tem pior prognóstico, com uma probabilidade alta de encontro de outros linfonodos comprometidos à linfadenectomia regional.

A presença de linfócitos infiltrando o melanoma cutâneo primário está associada com uma menor frequência de metástase no linfonodo sentinela, sendo considerada um fator prognóstico favorável (2).

A invasão de vasos sanguíneos por células do melanoma é um fator de mau prognóstico independente e também preditor de metástase (2, 29). A disseminação hematogênica permite ao melanoma produzir metástase à distância em vários órgãos. No estadiamento proposto pela 8^{ed} AJCC consideram-se as localizações das metástases numa escala relacionada ao mau prognóstico e sobrevida. O primeiro nível (M1a) é caracterizado pelas metástases cutâneas, de subcutâneo, músculo ou linfonodos não locorreionais. O segundo nível (M1b), com um prognóstico intermediário, é relacionado a metástase pulmonar. O terceiro nível (M1c), com um prognóstico mais adverso, é quando estão presentes metástases à distância em outras vísceras, mas sem comprometimento do sistema nervoso central. O último nível, com o pior prognóstico, é quando existe metástase no sistema nervoso central. Além disso, o número de metástases também tem sido considerado como importante fator prognóstico (2).

A desidrogenase láctica (LDH) sérica é um preditor independente de sobrevida nos pacientes no estágio IV, ou seja, com metástases à distância. Nesses pacientes a

LDH é o mais importante fator preditor de resposta ao tratamento, de progressão livre de doença, de sobrevida e de mortalidade (2).

Por último, o neurotropismo que é definido pela invasão perineural ou intraneural por células do melanoma, assim como a transformação neural do melanoma (formação de estruturas neuroides pelo mesmo tumor) estão associadas com alto risco de recorrência local, o que justifica a excisão do melanoma com margens amplas e/ou radioterapia adjuvante (2).

3.3 Antígeno leucocitário humano G

Os processos de evasão das neoplasias ao sistema de imunovigilância do hospedeiro compreendem três etapas que se superpõem. A primeira é a fase de eliminação, com a atuação do sistema imune inato para eliminar o tumor. A segunda é a fase de equilíbrio ou de persistência do câncer, quando o tumor desenvolve adaptações para se tornar menos imunogênico ou mais resistente ao sistema de imunovigilância (30). E a terceira fase é a de escape, na qual o tumor torna-se mais resistente, conseguindo evadir ou suprimir a resposta imune com maior destreza, com o consequente crescimento tumoral e geração de metástases (30, 31).

A expressão no microambiente tumoral do HLA-G, um antígeno principal de histocompatibilidade (MHC) não clássico de tipo I, que modula o padrão de citocinas para uma resposta imunitária de tipo Th2, representa uma estratégia imunossupressora mediada por alguns tumores. O HLA-G participa nas três fases do imunocontrol tumoral, especialmente na de escape imunológico (30, 32-36).

A molécula HLA-G apresenta-se solúvel e/ou ligada à membrana das células tumorais. Atua na proteção dessas células neoplásicas através da interação com receptores inibidores da lise mediada por linfócitos T CD8+, células “natural killer” (NK) e $\gamma\delta$ da imunidade inata do hospedeiro (30, 37, 38). Ainda, o HLA-G na fase de eliminação pode inibir a proliferação e induzir apoptose de células T CD8+ citotóxicas e NK ativadas (30, 39-42) e inibe a multiplicação de linfócitos $\gamma\delta$ (43).

Na fase de equilíbrio, o HLA-G atua na imunossupressão tumoral através de mecanismos indiretos como a estabilização do HLA-E da superfície das células tumorais. Essa molécula interage com receptores inibitórios das células NK e linfócitos T, abolindo a sua reatividade e outorgando à célula tumoral uma quase total resistência aos processos de lise (30, 44, 45). Também nesta etapa o HLA-G induz a diminuição de expressão de MHC-II pelas células dendríticas (CDs), interferindo em sua função de apresentação antigênica (46, 47).

Na fase de escape as células tumorais tendem a expressar somente o HLA-G na sua superfície, mais intensamente que nas etapas iniciais, o que as torna muito mais resistentes (30, 46). Na fase de escape o HLA-G induz imunotolerância local, e também sistêmica através da liberação sanguínea de sua forma solúvel (30). As células apresentadoras de antígeno (APCs), ao expressar o HLA-G inibem a proliferação de células T CD4+ e induzem a sua diferenciação para células T reguladoras (35, 39). Além disso, a expressão do HLA-G pelas células neoplásicas e CDs resulta na inibição da apresentação antigênica e interrupção da maturação de CDs com a consequentemente anergia, assim como afeta a migração destas últimas (35, 39, 43). Essas funções imunossupressoras do HLA-G têm sido relacionadas com a invasividade, atividade metastática e mau prognóstico de diferentes tipos de neoplasias (48).

O rápido crescimento do câncer e de metástase estão associados com hipóxia que estimula a produção do fator induzível por hipóxia 1 (HIF1) que, por sua vez, aumenta a expressão do HLA-G. Esses dois fatores também estimulam angiogênese e, portanto, o crescimento tumoral e potencial metastático (30, 44, 45, 47).

As células tumorais produzem citocinas imunossupressoras que aumentam a expressão do HLA-G, como por exemplo a IL-10 (46). Nesta etapa, a IL-10 é produzida em grandes quantidades, sendo um dos responsáveis mais importantes pelo aumento da expressão do HLA-G pelas neoplasias (30, 46). HLA-G e IL-10 são moléculas mutuamente estimuladoras na sua produção (32). As duas moléculas mencionadas são também produzidas pelas células inflamatórias que infiltram o tumor, como os macrófagos, linfócitos e CDs (30, 44). As células do infiltrado inflamatório promovem ativação do fator nuclear kB (NF-kB), um fator anti-apoptótico que incrementa a fração solúvel do HLA-G, contribuindo desse modo para a anergia sistêmica (32, 47). O HLA-G estimula a expansão do infiltrado local e também pode regular a atividade do NF-kB, que é um fator que no tumor induz proliferação celular e autossuficiência no seu crescimento, insensibilidade a fatores inibitórios de crescimento, resistência à apoptose, imortalidade celular, angiogênese, invasão tissular e metástases (49-51).

A expressão do HLA-G é considerada como um marcador de transformação maligna em neoplasias melanocíticas (52, 53) e também como marcador de presença de metástases no melanoma (54). Ibrahim *et al.* (52) estudaram a expressão do HLA-G em lesões melanocíticas benignas e vários tipos anatomoclínicos de melanoma e, entre eles, seis casos de MLA. No entanto, nesse trabalho, a expressão do HLA-G no MLA não foi especificamente relatada. Bezuhly *et al.* (54) observaram a expressão do HLA-G em apenas um caso de MLA entre os melanomas estudados.

O HLA-G é considerado um potente imunossupressor. A pequena expressão desta molécula é suficiente para induzir imunotolerância. Portanto, o bloqueio da expressão do HLA-G nos tumores representa possibilidade de estratégia terapêutica a ser abordada no tratamento de neoplasias (53).

O estudo do HLA-G em vários tipos de cânceres tem sido objeto de interesse de diversas pesquisas, sendo hoje aceito que o ideal é o seu estudo *in vivo* ou em tumores removidos cirurgicamente mais do que *in vitro*, dado que a expressão desta proteína é altamente dependente de fatores do microambiente, muito difíceis de controlar em linhagens celulares, especialmente de melanoma, onde ocorre uma gradual perda da expressão do HLA-G pelas células tumorais cultivadas *in vitro* (44, 53). Esse fato provocou resultados contraditórios quanto à expressão do HLA-G em linhagens celulares de melanoma nos experimentos *in vitro*. Esses resultados, portanto, não são comparáveis com aqueles obtidos do estudo de amostras de melanomas excisados dos doentes (53).

3.4 Interleucina 10

A IL-10 no microambiente tumoral é produzida pelas células tumorais, células inflamatórias infiltrantes, principalmente MM2 e linfócitos T (reguladores, CD4, CD8, NK), assim como por CDs, representando uma outra estratégia imunossupressora de evasão das neoplasias (55-58).

Essa interleucina inibe as funções citotóxicas das células NK (56, 59) e a produção de citocinas de perfil Th1 tais como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucinas 2 e 12 (56, 60).

A IL-10 inibe a expressão de MHC-I pelas células tumorais, mediante regulação negativa nos transportadores associados com o processamento antigênico (TAP 1 e 2) interno das células tumorais, tornando-as menos imunogênicas, para facilitar o escape imunológico (58, 61).

Além disso, a IL-10 induz o desenvolvimento de APCs tolerantes. Ainda, inibe a diferenciação e maturação das CDs, induzindo expansão de linfócitos T reguladores e produção de citocinas Th2 (57, 58, 60, 62).

A IL-10 interfere na interação entre as APCs (CDs e macrófagos) e os linfócitos T, induzindo “down-regulation” de MHC-II em APCs, bem como a inibição dos coestimuladores CD54, CD80 e CD86 e CD28, resultando na indução de células T CD4 e CD8 anérgicas (15, 56, 58, 60, 61, 63, 64). Além disso, a IL-10 intensifica a apoptose espontânea das CDs e pode suprimir a proliferação de linfócitos T (57, 61).

Por outro lado, a IL-10 produzida por células de melanoma atua como um fator de crescimento autócrino, auto-estimulando a proliferação de células neoplásicas, o que resulta no aumento dos níveis da IL-10 no microambiente tumoral (56). Além disso, a IL-10 induz o aumento da expressão do HLA-G nas células neoplásicas e este, por sua vez, induz a produção da IL-10, estabelecendo-se desta forma um ciclo vicioso (32).

A imunossupressão está estreitamente relacionada com o desenvolvimento de metástase em pacientes com melanoma e a IL-10 é um dos protagonistas no cumprimento desta função (56). Vários estudos identificaram uma correlação positiva dos níveis da IL-10, tanto no soro como no tecido tumoral, com a progressão neoplásica local, metástases e pior prognóstico de pacientes com melanoma (56, 58, 65).

A IL-10 pode ser detectada em cultivos de melanócitos *in vitro*. Mas os níveis da IL-10 produzidos pelos melanócitos mantidos em meio de cultura são extremamente baixos quando comparados com os observados nos melanomas *in vivo*. (56).

3.5 Macrófagos M2

Em vários tipos de cânceres, incluindo o melanoma, a presença de macrófagos no microambiente tumoral tem sido associada com um aumento do potencial de malignidade (66-68).

Uma ampla variedade de moléculas biologicamente ativas é produzida por células tumorais e do estroma do microambiente associado (69). Os macrófagos infiltrantes respondem a este meio diferenciando-se em fenótipos polarizados ou antagônicos. Nas etapas iniciais da carcinogênese predominam os macrófagos *clássicos* ou M1 (MM1), produtores de citocinas do perfil Th1. Estes têm funções pró inflamatórias, bactericidas, antiangiogênicas e antitumorais e expressam a molécula CD68, mas não a molécula CD163 (69-74).

Durante a progressão neoplásica ocorre mudança de fenótipo de MM1 para outra população de macrófagos, chamados de macrófagos *alternativos* ou M2 (MM2). Essa mudança é produto de estímulos do microambiente comandados principalmente por células tumorais, além de linfócitos B, T reguladores e Th2, que produzem citocinas desse perfil, sendo a mais importante a IL-10. Outras citocinas Th2 importantes também nesse processo de polarização são a IL-4, IL-13, além da citocina reguladora fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) (70, 74-77). Os MM2, por sua vez, recrutam linfócitos Th2 (78), promovendo e também produzindo citocinas do perfil Th2, sendo a mais importante também a IL-10 (que é fator autócrino para os MM2) e em segundo lugar o TGF- β e a IL-13. Mediante estas citocinas os MM2 suprimem a resposta Th1 e os MM1, desenvolvendo funções imunossupressoras que facilitariam a capacidade de crescimento e invasão tumoral. Além disso, os MM2 promovem a proliferação celular

do tumor, o remodelamento tecidual, angiogênese e metástase, favorecendo o mau prognóstico das neoplasias (66-71, 73, 74, 76, 79).

Os MM2 expressam as moléculas CD163 e CD206, que são consideradas seus marcadores específicos (69, 73-75, 80-84). É proposto que estes marcadores reconhecem diferentes espectros dessa mesma população macrofágica (74), sendo a expressão dessas duas moléculas dependente da IL-10 (85).

Vários estudos têm demonstrado que os macrófagos associados a alguns tumores exibem fenótipo predominante M2 (79-81). As neoplasias com MM2 no seu microambiente apresentam um pior prognóstico (69, 79). Os MM2 facilitariam o desenvolvimento tumoral devido à sua capacidade de produzir fatores proangiogênicos, entre eles os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) A, C e D, de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), de crescimento epidérmico (EGF), de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e o TGF- β (74, 75, 86, 87), com a consequente angiogênese e linfangiogênese que facilitaria o crescimento, invasividade, disseminação e metástase dos tumores (69, 79, 87). O PDGF, EGF, bFGF e o TGF, entre outros fatores de crescimento produzidos pelos MM2, exerceriam também um importante papel na manutenção e estímulo do crescimento e multiplicação das células tumorais (74).

Além disso, os MM2 estão envolvidos nos processos de remodelamento tecidual, por meio da produção de vários tipos de metaloproteinases como a 2 e 9, as quais degradam a matriz extracelular, facilitando a invasão tumoral e as metástases (69, 74, 82).

Por outro lado, os MM2 suprimem a resposta imune antitumoral através da produção de diversas citocinas como IL-10 e TGF- β e várias quimiocinas como

CCL17 e CCL22. Todos estes fatores, e especialmente CCL17 e CCL22 no melanoma, recrutam células T reguladoras, as quais suprimem a proliferação e as funções efetoras de linfócitos CD4+, CD8+ e NK (68, 74, 75, 88). A IL-10 e TGF- β produzidas pelos MM2 têm a capacidade de bloquear diretamente a proliferação de linfócitos T e a atividade citotóxica de células NK e CD8+ (78, 89). Ainda, os MM2 expressam altos níveis de arginase 1, que aumenta o catabolismo de L-arginina. A depleção desta no microambiente tumoral leva à alteração da expressão do receptor de células T, inibe a proliferação e aumenta a apoptose dessas células (75, 90).

A IL-10 produzida pelos MM2, além de todas as funções previamente expostas, aumentaria a expressão celular nos linfócitos do cofator inibitório da apresentação antigênica PD-L1, que é essencial também para a indução de tolerância antigênica, além de inibir a proliferação e atividade citotóxica de linfócitos (75, 88). A baixa expressão de MHC-II pelos MM2, devido a ação da IL-10 e TGF- β , torna esses macrófagos ineficientes para realizar a função de apresentação antigênica (76, 91-93). Por outro lado, da mesma forma que a IL-10 (61), o TGF- β produzido pelos MM2 deteriora a migração e aumenta a apoptose de CDs, o que diminui ainda mais a apresentação antigênica (89).

O maior número de MM2 no microambiente do melanoma tem sido correlacionado com progressão local, invasividade, metástase e mau prognóstico (74). Entretanto, não encontramos na literatura consultada estudos que avaliem a população de MM2 no MLA.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Seleção da casuística

Foram levantados todos os casos de MLA diagnosticados entre janeiro de 1992 e fevereiro de 2014, provenientes do laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica, da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Laboratório de Patologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

Os tumores foram revisados e classificados em: *in situ*, $\leq 1,0$ mm e $> 1,0$ mm de espessura; ulcerados, não ulcerados, com uma ou mais mitoses por mm^2 , sem mitoses, associados a metástase confirmada e sem metástase.

Foram incluídos no grupo associado a metástases os casos com categoria mínima N1 ou M1 no seu estadiamento, de acordo com os critérios definidos pelo "Eighth American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Melanoma staging system" (2). Melanomas *in situ* (os quais não têm capacidade de provocar metástase) ou tumores de espessura $\leq 0,6$ mm, sem evidência de metástase dentro de um período mínimo de cinco anos de seguimento (ou seja tumores de muito baixo potencial metastático) (2), constituíram o grupo de melanomas não associados a metástases. Nas análises comparativas entre tumores com metástase e sem metástase, não foram considerados os pacientes com metástases desconhecidas.

Dentro do mesmo período de tempo descrito, foram selecionados para comparação casos de MESs estritamente pareados com os MLAs quanto à espessura (*in situ*, $\leq 1,0$ mm e $> 1,0$ mm). Posteriormente, os MESs também foram classificados de

acordo com a presença ou ausência de ulceração, mitose/mm² e associação com metástase.

Os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes foram obtidos a partir de seus prontuários clínicos.

4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos todos os casos com amostras teciduais com conservação inadequada ou insuficientes para a realização de todos os marcadores pelas técnicas imuno-histoquímicas, assim como os casos sem acesso aos respectivos prontuários.

4.3 Aspectos éticos

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo aprovou a realização do estudo (parecer # 0477/11 – Anexo 1).

4.4 Técnicas de imuno-histoquímica

Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram obtidos a partir de fragmentos tumorais representativos, embebidos em parafina e colhidos em lâminas de vidro previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma

Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. A3648) a 2%. A seguir, os cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol de 20 e 10 minutos respectivamente, à temperatura ambiente. Na sequência, os espécimes foram hidratados em bateria decrescente de etanol (100%, 95% e 70%) e lavados em água destilada por cinco minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em câmara escura com três incubações em solução de peróxido de hidrogênio 3%, por 10 minutos cada.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente durante cinco minutos e submetidas a tratamento para exposição dos sítios antigênicos em calor úmido, em banho-maria a 95°C na solução "Target Retrieval Solution" pH 9,0 (cód. S2367, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) por 20 minutos. As lâminas para marcação do HLA-G permaneceram nessa solução e nas mesmas condições por 30 minutos. A seguir foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,4.

A seguir, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução "Dako protein block solution" (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Fez-se a incubação com os anticorpos primários diluídos (vide tabela 1 abaixo) em soroalbumina bovina (BSA) fração V (SERVA. 1930) 1%, acrescida de azida sódica 0,1% em solução PBS pH 7,4, "overnight" a 4°C.

Após o procedimento de lavagem das lâminas por duas vezes em PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada, procedeu-se à incubação do material, com os respectivos anticorpos para identificação da IL-10, CD163 e CD206. Fez-se a incubação com o anticorpo secundário biotilado "link universal" (LSAB-AP, cód. K0689, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) pronto para uso, em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C. Após esses procedimentos as lâminas foram lavadas em PBS pH 7,4

por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubadas com "Streptavidin-AP" (LSAB-AP, cód. K0689, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) por mais 30 minutos a 37°C.

Para identificação do HLA-G foi utilizado outro sistema de detecção, o AP EnVision™ G2 System/AP (cód. KK5355, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). Primeiramente as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário - "Link", em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C. Na sequência foram feitas duas lavagens de cinco minutos cada em PBS pH 7,4, seguidas de outra incubação com o polímero de amplificação marcado com a fosfatase alcalina, "AP enzyme (enhancer)", em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

A tabela 1 demonstra a procedência, clone/código, diluição de uso dos anticorpos e sistemas de revelação utilizados nas reações.

Tabela 1. Anticorpos, clones, códigos, marcas, diluição e sistema de detecção

Anticorpo	Clone	Código	Marca	Diluição	Sistema de detecção
HLA-G	4H84	SC-21799	Santa Cruz	1:50	AP EnVision™ G2
IL-10	policlonal	AF-217-NA	R&D Systems	1:20	LSAB-AP
CD163	10D6	NCL-CD163	Leica	1:50	LSAB-AP
CD206	5C11	MCA5552Z	AbD Serotec	1:100	LSAB-AP

Os sítios de ligações dos anticorpos foram visualizados com substrato/solução cromógena "PermaRed/AP" (cód. K0640, Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA, USA), na diluição 1:100. As lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos e contra coradas com Hematoxilina de Carazzi por 20 segundos. A seguir foram lavadas em água corrente, e secas à temperatura ambiente. A montagem das lâminas foi feita com resina "Permunt" (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100).

Todas as reações foram processadas concomitantemente com controles positivos e negativos. Fragmentos de placenta humana e de amígdala palatina foram utilizados como controles positivos para as reações do HLA-G e IL-10, respectivamente. Cortes histológicos de hanseníase virchowiana foram utilizados como controles positivos para as reações de CD163 e CD206. Os controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários que foram substituídos por soro não imune, ou anticorpos isotípicos não reagentes para os antígenos estudados.

A expressão do HLA-G e da IL-10 foi considerada positiva se as células tumorais exibiam imunomarcação vermelho brilhante na membrana e no citoplasma (33, 52, 94).

A expressão de CD163 e CD206 foi considerada positiva quando células mononucleadas (95) do infiltrado inflamatório do ambiente tumoral exibiram imunomarcação vermelho brilhante na membrana e no citoplasma (56, 79, 84, 96).

4.5 Captura e análise de imagens

Imagens digitais dos cortes histológicos selecionados foram capturadas com aumento de 100× em microscópio Nikon Eclipse E200 (Nikon, Tokyo, Japan) acoplado

com uma câmara digital Canon EOS Rebel T5i com o programa EOS digitais 28,0 (Canon, Tokyo, Japan).

As imagens digitais foram analisadas com dois ou três ampliações utilizando um monitor LED Smart TV de ultra-alta definição com tecnologia 4K de 43" (43" 4K-Ultra High definition Smart LED TV), 43UF69 LG (LG Electronics Inc., Korea).

As análises morfométricas dos marcadores HLA-G, IL-10, CD163 e CD206 foram realizadas com auxílio do "software" Image-Pro Plus 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

4.6 Análise morfométrica do antígeno leucocitário humano G e interleucina 10

As imagens digitais foram capturadas de toda a área tumoral de um corte histológico representativo selecionado. Primeiramente foi medida a área tumoral total do corte histológico e posteriormente na mesma secção histológica foi medida a área tumoral imunomarcada para HLA-G ou IL-10, respectivamente. Desse modo obteve-se a fração de área tumoral positiva (área tumoral imunomarcada /área tumoral total) para a expressão do HLA-G e IL-10 para cada um dos tumores avaliados.

4.7 Análise morfométrica de células com expressão das moléculas CD163 e CD206

Para a quantificação de MM2, evidenciados pelos marcadores CD163 e CD206, foram capturadas imagens digitais dos "hot spots" de cada um dos marcadores das regiões intratumoral e peritumoral até atingir uma área de 1,0 mm² para cada tumor

estudado, em cada uma das regiões mencionadas. Foi considerada como intratumoral a região ocupada pelas células do melanoma permeadas por células inflamatórias e peritumoral como a região de infiltrado inflamatório imediatamente justa tumoral. Os resultados para cada marcador foram expressos em número de células imunomarcadas por mm^2 , na área intratumoral e peritumoral respectivamente.

4.8 Análise estatística

Os resultados obtidos quanto a expressão das moléculas HLA-G, IL-10, número de macrófagos CD163+ e CD206+ dos casos de MLA e MES foram submetidos às seguintes comparações:

- Comparação entre os MLAs *in situ*, $\leq 1,0$ mm e $> 1,0$ mm; não ulcerados e ulcerados; com uma ou mais mitose/ mm^2 e sem mitoses; associados ou não a metástases.
- As mesmas comparações foram realizadas no grupo dos MESs.
- Comparação dos resultados entre os grupos de MLA e MES, considerando-se os critérios de espessura, ulceração, mitoses/ mm^2 e associação com metástases.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o "software" STATA 13.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

A suposição de normalidade foi corroborada pelo teste de Handsen e Doornik (97) e valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

As análises comparativas foram feitas pelo teste de Wilcoxon para comparação de dois grupos e o teste de Kruskal-Wallis para comparação de mais de dois grupos. A

média, mediana, o desvio-padrão e intervalos de confiança foram utilizados para a análise descritiva.

Foram realizadas análises de correlação entre os marcadores HLA-G e IL-10 e também entre CD163 e CD206 pelo teste de correlação de Pearson.

Fez-se um modelo de regressão logística binária incluindo todos os marcadores do estudo, para avaliar a sua influência na variável metástase.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Dos MLA revisados foram selecionados inicialmente 81 tumores. Quatorze amostras foram excluídas por má conservação do material embebido em parafina, e 67 espécimes bem preservados foram selecionados para o estudo.

Sessenta e sete casos de MES foram selecionados para comparação com os casos de MLA, sendo escolhidos por pareamento de acordo com a espessura de cada um dos tumores.

Os dados clínicos e histopatológicos dos grupos de pacientes com MLA e MES são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Dados clínicos e histopatológicos de doentes com melanoma lentiginoso acral (MLA) e melanoma extensivo superficial (MES)

		MLA Fr. N=67	MES Fr. N=67	Total Fr. Total=134
Sexo				
	Mulheres	36	35	71
	Homens	31	32	63
Idade (anos)				
	Média (σ)	63,58 ($\pm 13,7$)	57,88 ($\pm 13,6$)	60,73 ($\pm 13,9$)
	< 45	7	11	18
	45 - 65	24	34	58
	> 65	36	22	58
Raça				
	Branços	44	64	108
	Negros	22	2	24
	Asiáticos	1	1	2
Localização				
Geral	Cabeça e pescoço	-	7	7
	Tronco anterior	-	6	6
	Dorso	-	14	14
	MMSS (excluindo mãos)	-	19	19
	MMII (excluindo pés)	-	19	19
	Pés	62	1	63
	Mãos	5	1	6
Específica para pés e mãos	Pés			
	Dorso	-	1	1
	Planta	54	-	54
	Dedo (excluindo subungual)	6	-	6
	Subungual	2	-	2
	Mãos			
	Dorso	-	1	1
	Palma	2	-	2
	Dedo (excluindo subungual)	1	-	1
	Subungual	2	-	2
Lado	Direito	31	34	65
	Esquerdo	36	32	68
	Linha média	-	1	1
Espessura tumoral (Breslow - mm)				
	<i>In situ</i>	5	5	10
	≤ 1	8	8	16
	> 1	54	54	108
Ulceração tumoral (Para melanomas invasivos)				
	Ausente	17	23	40
	Presente	45	39	84
	Não aplicável (<i>in situ</i>)	5	5	10
Mitoses dérmicas tumorais/mm² (Para melanomas invasivos)				
	Ausente	10	10	20
	Presente	52	52	104
	Não aplicável (<i>in situ</i>)	5	5	10
Metástases				
	Ausente	8	8	16
	Presente	36	25	61
	Desconhecido	23	34	57

Fr.: Frequência; σ : Desvio padrão; mm: milímetro.

5.1 Expressão do antígeno leucocitário humano G

Cinquenta e quatro de 67 (80,1%) MLAs e 40 de 67 (60%) MESs mostraram expressão do HLA-G pelos melanócitos neoplásicos. A expressão do HLA-G ocorreu tanto em melanócitos atípicos intraepidérmicos como no componente invasivo dérmico (fig. 1).

Figura 1. (A) Melanoma lentiginoso acral (MLA) com imunomarcção para antígeno leucocitário humano G (HLA-G) em melanócitos atípicos intraepidérmicos. (B) MLA invasivo expressando HLA-G em melanócitos atípicos epidérmicos e dérmicos. (C) Melanoma extensivo superficial (MES) com melanócitos atípicos intraepidérmicos intensamente imunomarcados por HLA-G. (D) MES invasivo expressando HLA-G em melanócitos atípicos epidérmicos e dérmicos. (Técnica imuno-histoquímica com anticorpo anti - HLA-G. Aumento original de $\times 200$)

5.2 Expressão da interleucina 10

Sessenta e quatro de 67 (95,5%) MLAs e 55 de 67 (82%) MESs exibiram expressão da IL-10 em melanócitos neoplásicos. MLAs e MESs apresentaram expressão da IL-10 em melanócitos atípicos *in situ* e invasivos (fig. 2).

Figura 2. (A) Melanoma lentiginoso acral (MLA) com imunomarcção para interleucina 10 (IL-10) em melanócitos atípicos intraepidérmicos. **(B)** MLA invasivo expressando IL-10 em melanócitos atípicos epidérmicos e dérmicos. **(C)** Melanoma extensivo superficial (MES) com melanócitos atípicos intraepidérmicos imunomarcados por IL-10. **(D)** MES invasivo expressando IL-10 em melanócitos atípicos epidérmicos e dérmicos. (Técnica de imuno-histoquímica com anticorpo anti - IL-10. Aumento original de $\times 200$)

5.3 Macrófagos M2 imunomarcados por CD163 e CD206

MLAs e MESs exibiram presença de macrófagos imunomarcados para CD163 e CD206 no microambiente de tumores *in situ* e invasivos. As células imunomarcadas, tanto para CD163 como para CD206 apresentavam frequentemente morfologia dendrítica e ovoide (95). Estavam presentes permeando o tecido tumoral e em meio ao infiltrado inflamatório peritumoral (fig. 3).

Figura 3. Células mononucleadas imunomarcadas pelo anticorpo CD163 em meio ao infiltrado inflamatório intratumoral e peritumoral do melanoma lentiginoso acral (MLA) **(A)** e de melanoma extensivo superficial (MES) **(C)**. Células mononucleadas imunomarcadas pelo anticorpo CD206 em meio ao infiltrado inflamatório intratumoral e peritumoral de MLA **(B)** e de MES **(D)**. (Técnica imuno-histoquímica com os anticorpos anti - CD163 e CD206. Aumento original de $\times 200$)

5.4 Análise estatística

5.4.1 *Antígeno leucocitário humano G*

A expressão do HLA-G no grupo de MLA foi maior que no MES ($p < 0,05$) (Fig. 4A). A expressão do HLA-G em MLAs espessos, com ulceração, presença de mitose e metástase foi maior em comparação com os MESs com as mesmas características ($p < 0,05$). Ver fig. 5.

A expressão do HLA-G foi maior nos MLAs com mitoses do que nos MLAs sem mitoses ($p < 0,05$). Ver fig. 5.

Não houve, entretanto, diferenças nos MLAs quando se fez a comparação de acordo com os outros critérios histopatológicos (espessura e ulceração) assim como em relação a metástases.

Dentro do grupo MES não se observou diferenças de acordo as características analisadas.

5.4.2 *Interleucina 10*

A expressão da IL-10 no grupo de MLA foi maior que nos MESs ($p < 0,05$) (Fig. 4B). Os MLAs com Breslow $\leq 1,0$ mm, $> 1,0$ mm, não ulcerados e ulcerados exibiram maior expressão da IL-10 que os MESs com essas mesmas características ($p < 0,05$) (Fig. 6). Os MLAs com mitose e associados a metástases revelaram maior expressão da IL-10 que os MESs com mitoses e associados a metástases ($p < 0,05$) (Fig. 6).

A expressão da IL-10 pelos 36 casos de MLA associados a metástases foi maior que a dos 8 MLAs sem associação com metástases ($p<0,05$) (Fig. 6). Não houve, entretanto, diferenças nos MLAs quando se fez a comparação de acordo com os outros critérios histopatológicos de espessura, ulceração e mitose.

Dentro do grupo MES não se observou diferenças de acordo as características analisadas.

Figura 4. (A) Expressão do antígeno leucocitário humano G (HLA-G) em melanoma lentiginoso acral (MLA) e no melanoma extensivo superficial (MES). **(B)** Expressão da interleucina 10 (IL-10) em MLA e no MES

Figure 5. Expressão do antígeno leucocitário humano G (HLA-G) no melanoma lentiginoso acral (MLA) e melanoma extensivo superficial (MES) de acordo com a espessura, ulceração, mitoses/mm² e associação com metástase. Tis: tumor *in situ*

Figure 6. Expressão da interleucina 10 (IL-10) no melanoma lentiginoso acral (MLA) e melanoma extensivo superficial (MES) de acordo com a espessura, ulceração, mitoses/mm² e associação com metástase. Tis: tumor *in situ*

As expressões do HLA-G e IL-10 mostraram correlação positiva ($p < 0,05$) no conjunto de todos os melanomas estudados. Esta correlação positiva e estatisticamente significativa entre ambos marcadores também foi observada em tumores com espessura $>1,0$ mm, com ulceração e mitoses (tabela 3).

Tabela 3. Correlação da expressão do antígeno leucocitário humano G (HLA-G) e interleucina 10 (IL-10) no melanoma lentiginoso acral (MLA) e extensivo superficial (MES). Teste de correlação de Pearson

Coeficientes de correlação e p-values (MLA e MES juntos)										
	Global*		Breslow >1mm		Ulceração Presente		Mitose/mm ² Presente		Metástase Presente	
	IL-10		IL-10		IL-10		IL-10		IL-10	
HLA-G	r	valor-p	r	valor-p	r	valor-p	r	valor-p	r	valor-p
	0,2866	0,0008	0,3098	0,0011	0,3399	0,0016	0,0370	0,0001	0,2395	0,0630

* Sem característica específica.

5.4.3 Macrófagos M2 imunomarcados com os anticorpos CD163 e CD206

O número de MM2 marcados com o anticorpo CD163 no microambiente tumoral (infiltrado inflamatório intra e peritumoral) do MLA foi maior que no de MES ($p < 0,05$). O número de MM2 imunomarcados com o anticorpo CD206 foi maior no MLA que no MES somente no infiltrado peritumoral (tabela 4).

Tabela 4. Macrófagos M2 (células/mm²) imunomarcados com os anticorpos CD163 e CD206 no melanoma lentiginoso acral (MLA) e extensivo superficial (MES)

	Tipo de MM (Global)	Mediana	Média	Erro padrão	IC 95%		valor-p
Área intratumoral	CD163						
	MLA	135	151,12	14,44	122,55	179,69	0,0314*
	MES	104	108,72	10,06	88,81	128,62	
	CD 206						
	MLA	118	157,07	17,32	122,81	191,34	0,0831
	MES	74	102,88	11,49	80,15	125,61	
Área peritumoral	CD163						
	MLA	205	227,49	17,71	192,47	262,51	0,0009*
	MES	129	148,75	11,34	126,32	171,17	
	CD 206						
	MLA	175	205,1	16,52	172,44	237,77	0,0027*
	MES	106	145,18	14	117,5	172,86	

MM: melanoma maligno; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Os MLAs com espessura $>1,0$ mm apresentaram maior número de MM2 (CD163+ e CD206+) tanto na região intratumoral como peritumoral que os MESs de mesma espessura ($p<0,05$), assim como os MM2 CD206+ da região peritumoral dos MLAs *in situ* quando comparados aos MESs *in situ* (tabela 5).

O número de células imunomarcadas para CD163 e CD206 intratumorais dos MLAs espessos foi maior que os dos MLAs delgados (*in situ* e $\leq 1,0$ mm). O mesmo foi observado para os MESs.

Tabela 5. Macrófagos M2 (células/mm²) imunomarcados com os anticorpos CD163 e CD206 no melanoma lentiginoso acral (MLA) e extensivo superficial (MES), de acordo com a espessura do tumor

	Tipo de MM (Espessura/Breslow em mm)	Mediana	Média	Erro padrão	IC 95%		valor-p	
							Intra-grupo	Inter-grupos
Área intratumoral	CD 163							
	MLA Tis (<i>in situ</i>)	7	30,8	23,25	0	76,8	0,0007*	Tis (<i>in situ</i>)
	MLA T1 (≤1)	45	74,5	32,26	10,7	138,3		0,9142
	MLA T2 (>1)	154,5	173,61	15,71	142,53	204,69		T1 (≤1)
	MES Tis (<i>in situ</i>)	13	16,6	7,98	0,82	32,38	0,0001*	0,7122
	MES T1 (≤1)	37,5	47,13	19,07	9,41	84,84		T2 (>1)
	MES T2(>1)	118	126,37	10,84	104,92	147,82		0,0178*
	CD 206							
	MLA Tis (<i>in situ</i>)	0	5,4	5,4	0	16,08	0,0004*	Tis (<i>in situ</i>)
	MLA T1 (≤1)	15,5	41,63	17,81	6,39	76,86		0,0947
	MLA T2 (>1)	187,5	188,22	19,01	150,62	225,83		T1 (≤1)
	MES Tis (<i>in situ</i>)	25	29	13,05	3,2	54,8	0,0259*	0,3938
	MES T1 (≤1)	30,5	72,25	34,57	3,86	140,64		T2 (>1)
	MES T2 (>1)	106	114,26	12,84	88,87	139,65		0,0042*

Tabela 5 (Continuação). Macrófagos M2 (células/mm²) imunomarcados com os anticorpos CD163 e CD206 no melanoma lentiginoso acral (MLA) e extensivo superficial (MES), de acordo com a espessura do tumor

	Tipo de MM (Espessura/Breslow em mm)	Mediana	Média	Erro padrão	IC 95%		valor-p	
							Intra-grupo	Inter-grupos
Área peritumoral	CD163							
	MLA Tis (<i>in situ</i>)	107	250,6	118,22	16,76	484,44	0,9035	Tis (<i>in situ</i>)
	MLA T1 (≤1)	220,5	221,63	34,14	154,1	289,15		0,2506
	MLA T2 (>1)	203	226,22	19,05	188,54	263,9		T1 (≤1)
	MES Tis (<i>in situ</i>)	69	78,4	14,62	49,47	107,33	0,0419*	0,2076
	MES T1 (≤1)	139	187,38	48,8	90,85	283,9		T2 (>1)
	MES T2 (>1)	130	149,54	11,73	126,33	172,74		0,0038*
	CD 206							
	MLA Tis (<i>in situ</i>)	269	230,6	35,64	160,1	301,1	0,4453	Tis (<i>in situ</i>)
	MLA T1 (≤1)	146	176	41,58	93,75	258,25		0,0283*
	MLA T2 (>1)	173,5	207,06	19,37	168,75	245,37		T1 (≤1)
	MES Tis (<i>in situ</i>)	56	84,4	43,28	0	170,01	0,1485	0,0659
	MES T1 (≤1)	87	131	46,33	39,35	222,65		T2 (>1)
	MES T2 (>1)	109	152,91	15,47	122,3	183,51		0,0303*

MM: melanoma maligno; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; T: tumor.

Por outro lado, os MLAs ulcerados apresentaram maior número de MM2 marcados com os anticorpos CD163 e CD206 que os MESs ulcerados, tanto no componente intra como peritumoral ($p<0,05$). As células imunomarcadas por CD206 mostraram-se em maior número na região intratumoral dos MLAs ulcerados que naqueles MLAs sem ulceração, ($p<0,05$). Ver tabela 6.

Tabela 6. Macrófagos M2 (células/mm²) imunomarcados com os anticorpos CD163 e CD206 no melanoma lentiginoso acral (MLA) e extensivo superficial (MES) não ulcerados e ulcerados

							valor-p		
							Intra-grupo	Inter-grupos	
								Ausente	Presente
Tipo de MM (Ulceração)		Mediana	Média	Erro padrão	IC 95%				
Área intratumoral	CD163								
	MLA Ausente	91	130,941	32,345	66,92	194,97	0,0944	0,9346	0,0077*
	MLA Presente	154	172,111	16,33	139,79	204,44			
	MES Ausente	117	112,957	16,766	79,77	146,14	0,8899		
	MES Presente	104	118,026	13,196	91,91	144,15			
	CD 206								
	MLA Ausente	84	102,706	32,443	38,49	166,92	0,0115*	0,2478	0,0011*
	MLA Presente	190	194,467	20,249	154,39	234,55			
	MES Ausente	109	115,522	20,541	74,86	156,18	0,6993		
	MES Presente	74	104,897	15,052	75,1	134,69			
Área peritumoral	CD163								
	MLA Ausente	220	222,765	29,422	164,53	281	0,8808	0,1221	0,0029*
	MLA Presente	201	226,711	20,941	185,26	268,16			
	MES Ausente	142	175,391	22,659	130,54	220,24	0,2075		
	MES Presente	129	142,051	13,28	115,76	168,34			
	CD 206								
	MLA Ausente	175	196,882	30,782	135,95	257,81	0,8622	0,2619	0,016*
	MLA Presente	170	205,378	21,539	162,74	248,01			
	MES Ausente	121	165,304	23,408	118,97	211,64	0,2974		
	MES Presente	101	141,103	18,786	103,92	178,29			

MM: melanoma maligno; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Os MM2 revelados com os anticorpos CD163 e CD206 das regiões intra e peritumoral dos MLAs com mitoses foi maior que a dos MES com essa característica ($p<0,05$). Essa mesma população macrofágica (CD163+ e CD206+) diferiu na região intratumoral nos casos de MLAs com e sem mitoses ($p<0,05$). Ver tabela 7.

Tabela 7. Macrófagos M2 (células/mm²) imunomarcados com os anticorpos CD163 e CD206 no melanoma lentiginoso acral (MLA) e extensivo superficial (MES) e atividade mitótica

							valor-p		
Tipo de MM (Mitose/mm ²)		Mediana	Média	Erro padrão	IC 95%		Intra-grupo	Inter-grupos	
								Ausente	Presente
Área intratumoral	CD163								
	MLA Ausente	42	64,9	24,401	16,6	113,2	0,0007*	0,4053	0,0034*
	MLA Presente	158,5	179,269	15,897	147,8	210,74			
	MES Ausente	73,5	77,7	17,995	42,08	113,32	0,0885		
	MES Presente	114,5	123,538	11,552	100,67	146,4			
	CD 206								
	MLA Ausente	0	37,2	15,255	7	67,4	0,0004*	0,1183	0,0007*
	MLA Presente	195	194,712	19,154	156,8	232,63			
	MES Ausente	65	111	40,014	31,79	190,21	0,5593		
	MES Presente	102	108,423	12,384	83,91	132,94			
Área peritumoral	CD163								
	MLA Ausente	188,50	191,80	40,036	112,55	271,05	0,3891	0,8798	0,0007*
	MLA Presente	207	232,14	18,89	194,75	269,52			
	MES Ausente	139,5	178,2	40,075	98,87	257,53	0,6323		
	MES Presente	130	149,846	12,064	125,97	173,73			
	CD 206								
	MLA Ausente	146	165,1	35,626	94,58	235,62	0,3434	0,8501	0,008*
	MLA Presente	174,5	210,346	19,858	171,04	249,65			
	MES Ausente	125,5	174,5	42,723	89,93	259,07	0,5152		
	MES Presente	106	145,385	15,502	114,7	176,07			

MM: melanoma maligno; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Quando foi considerada a associação com metástases observou-se que o número de MM2 marcados com o anticorpo CD206 presentes na região intratumoral do grupo de MLA associado a metástase foi maior que nos MESs com essa mesma característica ($p < 0,05$). Ver tabela 8.

Na análise de cada um dos grupos de melanoma em separado (MLA e MES), na comparação dos tumores associados e não associados a metástase, observamos que os tumores com metástase mostraram maior número de MM2 (CD163+ e CD206+) intratumorais que os tumores não associados a metástase ($p < 0,05$). Além disso, a população de MM2 imunomarcados com o anticorpo 163 da região peritumoral dos MES com metástase também foi maior que daqueles sem metástase ($p < 0,05$). Ver tabela 8.

Tabela 8. Macrófagos M2 (células/mm²) imunomarcados com os anticorpos CD163 e CD206 no melanoma lentiginoso acral (MLA) e extensivo superficial (MES) e associação com metástase

							valor-p		
							Intra-grupo	Inter-grupos	
								Ausente	Presente
Tipo de MM (Metástase)	Mediana	Média	Erro padrão	IC 95%					
Área intratumoral	CD163								
	MLA Ausente	138	154	62,292	29,66	278,34	0,0149*	0,2900	0,0835
	MLA Presente	165,5	169,611	16,159	137,36	201,87			
	MES Ausente	7,5	12,5	7,837	0	28,14	0,0001*		
	MES Presente	119	137,68	19,824	98,11	177,25			
	CD 206								
	MLA Ausente	89	67	34,152	0	135,17	0,0006*	0,5836	0,0305*
	MLA Presente	195	196,972	21,816	153,43	240,52			
	MES Ausente	15,5	16,5	7,399	1,73	31,27	0,0003*		
	MES Presente	109	128,64	21,634	85,46	171,82			
Área peritumoral	CD163								
	MLA Ausente	157	162,333	60,104	42,37	282,3	0,5428	0,5995	0,4676
	MLA Presente	195,5	213,056	20,335	172,47	253,64			
	MES Ausente	121,5	157,25	38,756	79,89	234,61	0,0416*		
	MES Presente	147	194,48	24,547	145,48	243,48			
	CD 206								
	MLA Ausente	147	140	31,086	77,95	202,05	0,7725	0,0156*	0,1548
	MLA Presente	170	212,583	24,893	162,9	262,27			
	MES Ausente	87	88	21,981	44,13	131,87	0,0741		
	MES Presente	119	169,68	28,182	113,43	225,93			

MM: melanoma maligno; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Houve correlação positiva e estatisticamente significativa entre os marcadores macrofágicos CD163 e CD206, tanto na região intra como peritumoral. Essa correlação manteve-se mesmo quando considerados separadamente os tumores com espessura $>1,0$ mm, presença de ulceração, mitoses e associação com metástases ($p<0,05$). Ver tabela 9.

Tabela 9. Correlação de Pearson entre os marcadores CD163 e CD206 no microambiente do melanoma lentiginoso acral (MLA) e no melanoma extensivo superficial (MES)

Coeficientes de correlação e <i>p-values</i> de acordo a área (MLA e MES juntos)																					
	Global*				Breslow >1mm				Ulceração Presente				Mitose/mm² Presente				Metástase Presente				
	CD163 T		CD163 P		CD163 T		CD163 P		CD163 T		CD163 P		CD163 T		CD163 P		CD163 T		CD163 P		
	r	valor-p	r	valor-p	r	valor-p	r	valor-p	r	valor-p	r	valor-p	r	valor-p	r	valor-p	r	valor-p	r	valor-p	
CD206 T	0,6089	0,0000			0,5547	0,0000			0,5204	0,0000			0,5733	0,0000			0,5010	0,0000			
CD206 P			0,3881	0,0000			0,3694	0,0001			0,3773	0,0004			0,3790	0,0001			0,5084	0,0000	

T: intratumoral; P: peritumoral.
 * Sem característica específica.

Para avaliar a possível relação da expressão tumoral do HLA-G e IL-10 e da população de MM2 (imunomarcados por CD163 e CD206) na ocorrência de metástases, fez-se um modelo binário de regressão logística no qual foram incluídas inicialmente todas as variáveis do estudo e sua interação com o evento presença de metástase. Somente a variável número de macrófagos imunomarcados pelo anticorpo CD206 da região intratumoral mostrou-se significativa e relacionada com o evento. A partir dessa seleção, foi feita a análise isolada dessa variável em relação à presença de metástase, no modelo de regressão logística binário, assumindo-se MM2 CD206+ da região intratumoral como variável isolada predominante (tabela 10).

Considerando-se essa variável, o modelo alcançou um bom índice de qualidade ou perfeição de ajuste (χ^2 goodness of fit test = 0.9999), ou seja, corresponde a um modelo de regressão logística válido para a variável nele estudada.

O coeficiente *Pseudo R²* foi 41,10%, representando que a explicação da variabilidade do resultado metástase pela variação do número de macrófagos intratumorais imunomarcados pelo anticorpo CD206 ocorre isoladamente em grande fração dos casos (tabela 10).

Além disso, neste modelo para cada unidade de aumento do marcador CD206 intratumoral, a probabilidade de associação com metástases aumenta em 3%, mostrado pelo valor da OR ("odds ratio") de 1,03 (IC 95%: 1,01-1,05). Ver tabela 10.

Tabela 10. Regressão logística binária para as variáveis metástase e número de macrófagos CD206+ (células/mm²) no infiltrado intratumoral

					Observações	77
					LR (Chi²)	32,34
					valor-p	0,000
					Pseudo R²	0,4110
Metástase	OR	Erro padrão	z	valor-p	IC 95%	
CD206 T	1,03	0,01	3,44	0,00	1,01	1,05
Constante	0,43	0,22	-1,62	0,10	0,16	1,19
Chi² "goodness of fit test" (valor-p)				0,9999		
Área abaixo da curva ROC				0,9027		

CD206 T: CD206 intratumoral; OR: "odds ratio"; LR: "likelihood ratio"; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Ainda, para a variável CD206 intratumoral, a área abaixo da curva ROC representou 90,27% da população estudada, demonstrando uma alta capacidade de classificação do resultado metástase pela variável (fig. 7).

Figura 7. Curva ROC para sensibilidade e especificidade da variável número de macrófagos CD206+ (células/mm²) no infiltrado intratumoral em relação ao evento presença de metástases

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 Melanoma lentiginoso acral

O MLA é um subtipo de melanoma raro na população geral (1), por este motivo são poucos os estudos dessa neoplasia com casuísticas grandes (8). O MLA foi descrito em 1976 (16) e começou a ser relatado formalmente nos EUA em 1986 (1). Nesse trabalho tivemos a oportunidade de estudar um número considerável de MLAs, coletados durante um período de pouco mais de 22 anos em dois centros de referência no Brasil.

Em concordância com a literatura, a nossa casuística teve uma distribuição similar entre os gêneros (54% mulheres e 46% homens) e 54% dos pacientes idosos maiores de 65 anos (média 63.58; faixa etária 30 a 92 anos). A raça declarada predominante dos pacientes com MLA do nosso estudo foi a branca (66%) seguida da negra (33%), o qual não segue a tendência da literatura que mostra um predomínio da raça negra (1). Isto pode ser entendido considerando que existe uma grande miscigenação no Brasil e que os brancos brasileiros provavelmente compartilham aspectos genéticos de seus ascendentes da raça negra.

Dos pacientes com MLA desta investigação, 93% tiveram o tumor nos pés. Do total dos casos a sua localização específica foi 81% na região plantar, 9% na pele dos pododáctilos e 3% nas regiões subunguais das extremidades inferiores. Esta distribuição anatômica também foi semelhante aos relatados em outro estudo de MLA em população latino-americana da Colômbia (6).

Os casos de MLA de nossa casuística, no momento do diagnóstico, apresentaram-se em sua maioria com tumores de espessura $>1,0$ mm (81%), ulcerados

(67%) e com mitoses presentes (78%). Além disso, em 54% destes pacientes foi confirmada a presença de metástase durante sua evolução. Essas características são em parte semelhantes às daquelas de estudo de MLA nos EUA. Nesse estudo a maioria dos pacientes foram diagnosticados em etapas mais avançadas que o grupo OMC, sendo 59% dos tumores com Breslow $>1,0$ mm e somente 38% dos casos foram classificados no estágio I (1).

O diagnóstico geralmente em etapas avançadas da neoplasia sustenta a hipótese de que o mau prognóstico do MLA seria relacionado mais com o atraso no diagnóstico e conduta terapêutica que por uma característica própria do tumor. Não obstante, os doentes com MLA têm uma sobrevida em 10 anos significativamente menor que aqueles com OMC com estadiamento igual (1).

Outro estudo que avaliou casuística grande de MLA em população caucasiana confirma a pior evolução e sobrevida dos doentes. Nessa mesma pesquisa o MLA teve uma sobrevida em 5 anos de 29%, e foi menor que a de MES localizado em regiões acrais (mãos e pés), com $p<0,05$. Esse trabalho demonstrou que não somente a localização acral é suficiente para explicar o mau prognóstico associado a melanomas nestas regiões anatômicas, mas também o tipo histológico (21).

Esses resultados estimulam a procura de fatores biológicos intrínsecos do MLA que possam explicar seu pior prognóstico comparado com OMC e especificamente com MES que é o subtipo de melanoma mais frequente na população geral (1).

Demonstramos a maior expressão do HLA-G e IL-10 pelas células neoplásicas, assim como o maior número de MM2 presentes no microambiente do MLA, quando comparado ao MES. Esses resultados sugerem que os marcadores e células estudadas podem ser fatores relacionados ao comportamento biológico mais agressivo deste tipo clinicopatológico de melanoma cutâneo.

6.2 Antígeno leucocitário humano G

A expressão do HLA-G tem sido relacionada com os mecanismos regulatórios da resposta imune (32-36, 48). O HLA-G expresso pelo tecido neoplásico e mesmo solúvel presente no soro dos doentes, tem sido objeto de estudo em várias condições neoplásicas (48) e mesmo no melanoma cutâneo (39, 52, 98-101). A expressão do HLA-G nos processos neoplásicos tem sido considerada como bom preditor de malignidade e de progressão tumoral, uma vez que a sua expressão ocorre em tumores de alto grau histológico e em etapas avançadas. Além disso, em outros processos neoplásicos o HLA-G mostra significativa correlação com mau prognóstico (46, 49).

Não encontramos estudos que enfoquem especificamente a participação do HLA-G no MLA. O MLA é variante clínico-patológica de melanoma que se caracteriza por comportamento biológico mais agressivo (1). Os mecanismos patogénéticos relacionados e essa agressividade do MLA ainda permanecem por ser melhor elucidados (12). O nosso estudo é o primeiro a focar a expressão do HLA-G em um grande número de casos de MLAs. O MES foi escolhido como grupo controle por se tratar do tipo clínico-patológico mais frequente de melanoma cutâneo e por ser uma variante de comportamento biológico mais favorável (1, 21).

Demonstramos, no presente estudo, que o MLA exhibe maior expressão do HLA-G que o grupo de MES. Essa característica pode representar um fator relacionado a reconhecida agressividade do MLA (1). Além disso, a não expressão do HLA-G no lentigo maligno, que representa a variante clínico-patológica de melanoma cutâneo de comportamento mais indolente e menos agressivo (52), corrobora o possível papel dessa molécula como um dos fatores relacionados à maior agressividade do MLA.

6.2.1 Antígeno leucocitário humano G e espessura do tumor

A espessura do tumor (Breslow) é uma das características mais fortemente associadas ao pior prognóstico dos pacientes com melanoma (2, 27, 29, 102). Demonstramos que os MLAs mais espessos (espessura >1,0 mm) apresentam maior expressão do HLA-G que os MESs de mesma espessura estudados.

A relação da maior expressão do HLA-G e espessura do melanoma (em outras variantes clínico-patológicas que não o MLA) é conflitante na literatura. Alguns autores demonstraram ocorrer aumento da expressão do HLA-G de acordo com a maior espessura dos tumores (52). Outros trabalhos, entretanto, não encontraram diferenças na imunomarcagem do HLA-G de melanomas finos ou espessos (33). Ressaltamos que nenhum desses estudos especifica o tipo clínico-patológico dos melanomas avaliados, no entanto, foi sugerido que a invasividade do melanoma parece ser facilitada pelo aumento da expressão do HLA-G (48, 52).

6.2.2 Antígeno leucocitário humano G, ulceração e mitose

Ulceração e mitose são características relacionadas ao mau prognóstico dos pacientes com melanoma cutâneo (27, 29, 102). Demonstramos também que os MLAs ulcerados e que exibem pelo menos uma mitose por mm² apresentaram maior expressão do HLA-G em comparação com o grupo de MES com essas mesmas características. Além disso, observamos maior expressão do HLA-G no grupo de MLA com mitoses em comparação com o grupo de MLA sem mitoses. Esses dados reforçam o possível papel do HLA-G na progressão e pior comportamento biológico do MLA.

Nossos resultados em relação à presença de ulceração e expressão do HLA-G, entretanto, diferem daqueles observados por Fang *et al.* (33). Esses autores ao estudar casuística composta por melanomas com e sem ulceração, embora sem especificação de que tipo clínico-patológico de melanoma, não observaram diferença na expressão do HLA-G em relação a presença de ulceração.

6.2.3 Antígeno leucocitário humano G e metástase

O papel imunossupressor do HLA-G têm sido associado ao aumento da invasividade e atividade metastática tumoral (48). A expressão do HLA-G no melanoma é considerada um marcador de potenciais metástases, inclusive de melanomas finos (54). O aumento dos níveis séricos do HLA-G em pacientes com melanoma tem sido relacionados à presença de metástases linfonodais e mesmo em trânsito (103). Em nossa casuística, houve uma maior expressão do HLA-G no MLA com metástases em comparação com o MES associados a metástase.

Não avaliamos a expressão do HLA-G nas metástases dos casos de MLA em nosso estudo. Embora, há uma pesquisa que relata expressão desse antígeno em 37% das amostras de tecido de melanoma metastático (39).

6.3 Interleucina 10

A IL-10 é um potente imunossupressor e seus efeitos locais e sistêmicos representam uma estratégia de evasão tumoral da resposta imune de grande importância no melanoma (60).

Demonstramos que a expressão da IL-10 no MLA é maior que no MES. Este último tipo clínico-patológico de melanoma cutâneo é um subtipo de melanoma com comportamento biológico menos agressivo (21). No presente estudo, a maior expressão da IL-10 no MLA associou-se às características histopatológicas relacionadas ao pior comportamento clínico e prognóstico do melanoma cutâneo, tais como a espessura do tumor, ulceração, mitoses e metástase (27, 29, 102).

6.3.1 Interleucina 10 e espessura do melanoma

Alguns estudos abordaram a associação da IL-10 e a progressão do melanoma, sendo considerada como um dos fatores promotores da progressão e invasão tumoral (56, 59, 60, 104). A IL-10 favorece a passagem da fase de crescimento radial para vertical do melanoma, sendo que esta molécula aumenta progressivamente a sua expressão desde os melanomas *in situ* (33%), invasivos (89%) e metastáticos (100%). A IL-10 mostra correlação positiva com a espessura do melanoma (56). Outra evidência do papel da IL-10 na facilitação da progressão do melanoma é o aumento dos níveis séricos dessa citocina com o aumento do índice de Breslow nos doentes com melanoma (105).

Em nosso estudo, observamos que a expressão da IL-10 foi maior nos MLAs de espessura ≤ 1 mm e espessos em comparação com o MES. O MLA, mesmo nas suas fases iniciais, expressa esse fator relacionado à invasividade, fato que estaria associado ao seu comportamento biológico mais agressivo.

6.3.2 Interleucina 10, ulceração e mitose

Nossa revisão da literatura não encontrou nenhum estudo que correlacione a expressão da IL-10 com ulceração e a mitose no melanoma. Observamos maior expressão da IL-10 nos MLAs com ulceração e mitose em comparação com os grupos de MES, com essas mesmas características. Podemos considerar que a maior expressão da IL-10 no MLA pode ser um dos fatores relacionados a essas características de mau prognóstico do melanoma (27, 29, 102). Por outro lado, os MLAs não ulcerados também apresentaram maior expressão da IL-10 que os MESs sem ulceração. Podemos dizer que o MLA apresenta essa característica relacionada aos mecanismos de supressão da resposta imunológica antitumoral já em suas fases iniciais, quando comparado com melanoma de comportamento biológico menos agressivo.

6.3.3 interleucina 10 e metástase

A maior expressão da IL-10 nas lesões primárias de MLAs associadas a metástases comprovadas em comparação com MES, pode estar relacionada com o envolvimento desta citocina na agressividade do MLA.

A expressão da IL-10 foi previamente associada com metástases e pior sobrevida em pacientes com melanoma, entretanto não especificamente casos de MLA (56, 59, 60). Nas metástases cutâneas de melanomas foi verificada menor expressão da IL-10 e de seu receptor que na pele sadia. Entretanto, vale ressaltar que a metástase cutânea pode não apresentar as mesmas características que o tumor primário (106).

Os níveis séricos da IL-10 também mostram-se aumentados em concordância com a progressão do melanoma, sendo mais altos de acordo com o pior estadiamento dos pacientes, incluindo aqueles com metástases à distância (107).

Em nosso estudo observamos que os MLAs associados a metástases (36 casos) apresentaram maior expressão da IL-10 que os MLAs não associados a metástase após cinco anos de seguimento (8 casos). Por outro lado, não podemos afastar a possibilidade de que a diferença numérica entre os dois grupos de MLA comparados pode ter influenciado esse resultado.

6.4 Antígeno leucocitário humano G e interleucina 10 na progressão/invasão tumoral e ulceração dos grupos de melanoma lentiginoso acral e de melanoma extensivo superficial

Se considerarmos a espessura e ulceração do melanoma como fatores relacionados à progressão das lesões (2), é interessante ressaltar que os resultados obtidos nesse trabalho não demonstraram haver diferenças significativas na expressão do HLA-G e IL-10 dentro do grupo de MLA e de MES em relação a essas características. É possível que outros fatores patogênicos, combinados com os aqui estudados podem também estar relacionados com a progressão das lesões de melanoma.

6.5 Macrófagos M2 imunomarcados pelos anticorpos CD163 e CD206 no microambiente de melanoma

Os MM2 têm funções anti-inflamatórias e proangiogênicas (70, 71). Os macrófagos associados ao tumor (TAM) exibem fenótipo predominante de MM2 (80). Essa população macrofágica presente no microambiente tumoral tem sido relacionada com o pior prognóstico das lesões e mesmo proposta como um potencial alvo na terapêutica antineoplásica (81).

Os MM2 promovem o crescimento tumoral devido à sua capacidade de estimular a produção do VEGF A, C e D que resulta em angiogênese e linfangiogênese. Estas auxiliam o crescimento invasivo dos tumores e sua consequente disseminação metastática (86, 87, 108) .

Nossa investigação é a primeira a demonstrar a participação dos MM2 no ambiente tumoral do MLA.

Os trabalhos encontrados na literatura médica enfocam a participação dessa subpopulação macrofágica principalmente no melanoma ocular humano (72, 79), em melanomas cutâneos em geral sem focar essa análise em um tipo histológico específico (69) e em modelos experimentais de melanoma (108). A maior densidade de TAM estaria associada a maior invasividade e metástase nos melanomas cutâneos e de mucosa (109, 110).

Optamos por demonstrar os MM2 através de sua marcação com dois anticorpos (CD163 e CD206), uma vez que existe controvérsia na literatura sobre qual seria o melhor marcador dessa subpopulação macrofágica nos tecidos (82), mas observamos resultados bastante semelhantes com os dois marcadores.

Optamos por fazer a análise morfométrica dos MM2 nas regiões intra e peritumoral separadamente, uma vez que microambientes diferentes podem influenciar o macrófago a adquirir funções específicas para colaborar com os requerimentos das células neoplásicas (110).

Os nossos resultados demonstraram que o microambiente tumoral do MLA exhibe maior número de MM2 que o de MES. Esse seria mais um fator relacionado ao mau comportamento biológico do MLA, uma vez que os MM2 presentes no microambiente tumoral estão relacionados ao pior prognóstico de neoplasias (69, 79).

6.5.1 Macrófagos M2 no microambiente tumoral, espessura, ulceração e mitose

Demonstramos que os MLAs mais espessos (Breslow $>1,0$ mm), ulcerados e apresentando mitoses ($>1/\text{mm}^2$) apresentaram uma maior expressão de macrófagos CD163+ e CD206+ no infiltrado inflamatório intratumoral e peritumoral comparado com os MESs com aquelas mesmas características histopatológicas. Os melanomas que apresentam espessura $>1,0$ mm, ulceração e mitoses são considerados tumores de pior prognóstico (27, 29, 102). Nós observamos que, entre os melanomas estudados com essas características histopatológicas vinculadas ao mau prognóstico, o grupo de MLA teve ainda um maior número de MM2 no seu microambiente. Esses resultados estão de acordo com os de Storr *et al.* Esses autores demonstraram associação do alto número de macrófagos (CD68+) infiltrantes e as características histopatológicas de maior agressividade no melanoma (tumores espessos, ulcerados e alta taxa mitótica).

Entretanto, nesse trabalho não houve a discriminação entre MM1 e MM2 do infiltrado do microambiente tumoral (111).

A espessura do tumor é uma das características mais estreitamente vinculadas com o mau prognóstico em pacientes com melanoma (27, 29, 102). Tanto no grupo de MLA, como no de MES verificamos um maior número de MM2 CD163+ e CD206+ no infiltrado intratumoral dos tumores mais espessos. Esta mesma diferença foi observada na área peritumoral do MES na análise de MM2 CD163+. Esses resultados demonstram haver relação entre o aumento da espessura/invasão dos dois tipos histológicos de melanoma estudados com a população de MM2, especialmente aqueles presentes no microambiente intratumoral. Este resultado é concordante com o relatado por Storr *et al.* (111) e Jensen *et al.* (69), embora esses autores não tenham focado o MLA isoladamente.

Além disso, o número de MM2 CD206+ do infiltrado intratumoral dos MLAs ulcerados foi maior que o daqueles MLAs não ulcerados. Esses resultados são concordantes com os de Storr *et al.* (111) que encontraram maior número de macrófagos infiltrando o tumor nos melanomas ulcerados e de Jensen *et al.* (69) que demonstraram maior número de MM2 na região peritumoral dos melanomas ulcerados.

Observamos também maior número de MM2 imunomarcados tanto por CD163 como por CD206 no infiltrado inflamatório intratumoral dos MLAs com mitoses quando comparados aos MLAs sem mitoses. A presença de mitose é uma característica relacionada ao pior prognóstico do melanoma (27, 29, 102). Portanto, a maior densidade de MM2 no ambiente intratumoral dos MLAs com mitose pode ser considerada um fator relacionado à promoção da progressão do melanoma, e do MLA em particular. Na literatura foi relatada uma maior densidade de macrófagos infiltrando o tumor nos melanomas com índice mitótico alto (111).

6.5.2 Macrófagos M2 no microambiente tumoral e metástase

Os MM2 estão envolvidos na promoção da proliferação celular, invasividade, angiogênese e finalmente a metástase de neoplasias (66-71, 79). Nesse estudo encontramos uma maior densidade de MM2 CD206+ no infiltrado inflamatório intratumoral dos MLAs associados a metástases do que nos de MESs também com metástases. A associação de metástase com o maior número de MM2 (CD163+ e CD206+) no microambiente intratumoral também foi observada quando comparados os MLAs com e sem metástase, assim como os MES associados ou não a metástases.

Os nossos resultados são concordantes com os de Emri *et al.* (2013). Esses autores observaram correlação entre macrófagos CD163+ infiltrando o melanoma e o desenvolvimento de metástases. Essa pesquisa, entretanto, não envolveu casos de MLAs (112). O número aumentado de macrófagos infiltrando o melanoma correlaciona-se com a densidade microvascular e invasão angiolinfática pela neoplasia. Portanto, os macrófagos têm papel importante no crescimento e disseminação do melanoma (111).

A população de MM2 no microambiente do melanoma e de outros tipos de tumores tem sido relacionada ao pior desfecho evolutivo dos pacientes (79). A densidade do infiltrado de macrófagos CD163+ na região intratumoral exibe relação com a menor sobrevida dos doentes com melanoma cutâneo (69). Os resultados de nosso trabalho sugerem fortemente que os MM2 do microambiente intratumoral do MLA devem também ser fatores envolvidos no comportamento biológico ruim e maior agressividade desse subtipo clínico-patológico de melanoma.

6.6 Análise conjunta dos fatores regulatórios dependentes das células neoplásicas e do microambiente tumoral possivelmente implicados no comportamento biológico do melanoma lentiginoso acral

A análise estatística realizada demonstrou haver no MLA uma correlação positiva entre a expressão do HLA-G e IL-10, que são fatores imunorregulatórios envolvidos na evasão das neoplasias à resposta imunológica do hospedeiro e promotores da progressão tumoral. Desse modo, acreditamos que a escolha desses marcadores foi adequada para a análise proposta, uma vez que a IL-10 promove a expressão do HLA-G pelas células neoplásicas e este, por sua vez induz a produção da IL-10, estabelecendo-se um círculo vicioso (32). A IL-10 também está envolvida na polarização de MM2 (74), desse modo haveria uma relação entre a maior densidade de MM2 no microambiente do MLA e a expressão da IL-10 pelos melanócitos neoplásicos.

Houve também correlação positiva entre os marcadores de MM2 analisados (CD163 e CD206). Esse resultado sugere que os marcadores escolhidos foram adequados para demonstrar a população de MM2 no microambiente dos melanomas estudados. A identificação de MM2 nos tecidos tem sido tema de controvérsias na literatura, em particular para a demonstração desse subtipo de macrófagos nos microambientes neoplásicos (82).

A expressão do HLA-G e da IL-10 também pode ocorrer em células inflamatórias que infiltram o tumor, como os macrófagos, linfócitos e CDs (30, 44, 82). Nos casos imunomarcados com os anticorpos anti - HLA-G e anti - IL-10 observamos a expressão dessas moléculas não somente pelas células melanocíticas neoplásicas, mas

também por algumas células da resposta inflamatória do microambiente tumoral, embora de maneira pouco expressiva (resultado não ilustrado). Optamos, entretanto, por quantificar manualmente a expressão do HLA-G e da IL-10 pelos melanócitos neoplásicos, uma vez que na análise morfométrica por um “software” automatizado, as células da resposta inflamatória intratumoral imunomarcados para HLA-G e IL-10 poderiam eventualmente ser confundidos com células neoplásicas imunomarcadas, supervalorizando a expressão tumoral de HLA-G e IL-10.

O modelo de regressão logística binário realizado demonstrou que o número de MM2 intratumorais imunomarcados pelo anticorpo CD206 foi o fator de maior poder de associação com o evento metástase. Nesse modelo, a cada unidade de incremento do marcador CD206 intratumoral, a probabilidade de associação com metástases aumenta em 3%. Além disso, a variável MM2 CD206+ intratumoral teve o potencial de classificar corretamente o resultado metástase em 90,27% da casuística estudada. Além disso, a variável MM2 CD206+ intratumoral apresentou isoladamente a capacidade de explicar em 41,10% a variabilidade do resultado metástase.

Jensen *et al.* demonstraram que pacientes com melanomas com denso infiltrado de MM2 na região intra ou peritumoral apresentam menor sobrevida (69). O aumento de mortalidade devido a metástases também foi relacionada com o maior número de MM2 no melanoma ocular (79).

Essa tese é a primeira investigação a demonstrar a participação do HLA-G, IL-10 e dos MM2 no microambiente tumoral do MLA. Não pudemos, entretanto, analisar a relação da expressão do HLA-G, IL-10 e densidade de MM2 com o tempo de sobrevida e morte dos doentes estudados devido às dificuldades de seguimento da casuística atendida no nosso complexo hospitalar. Muitos doentes atendidos são procedentes de diferentes regiões do país e geralmente retornam aos seus locais de origem após os

procedimentos terapêuticos. Entretanto, o evento metástase é uma característica de agressividade das neoplasias e fator de mau prognóstico. Os resultados obtidos sugerem fortemente que as características inerentes ao próprio MLA, como a expressão do HLA-G e IL-10, assim como os MM2 do seu microambiente tumoral, são fatores relacionados ao seu comportamento biológico agressivo e mau prognóstico.

Os resultados obtidos podem contribuir para o estudo e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que visem bloquear os fatores imunorreguladores inerentes do tumor e presentes no microambiente tumoral, para promover e melhorar a resposta imunitária antitumoral de doentes com melanoma, especialmente aqueles que possuem variantes de tumores de comportamento biológico mais agressivo como o MLA.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- A expressão do HLA-G e da IL-10 é maior no MLA que no MES.
- No presente estudo, a maior expressão do HLA-G e da IL-10 no MLA associou-se às características histopatológicas relacionadas ao pior prognóstico do melanoma cutâneo, tais como a espessura do tumor, ulceração, mitoses e metástase.
- A IL-10 expressa pelos melanócitos neoplásicos, representaria fator imunossupressor presente nas fases iniciais da progressão tumoral do MLA, uma vez que esses tumores de espessura ≤ 1 mm e não ulcerados já exibem maior expressão dessa citocina que os MESs com as mesmas características.
- No MLA ocorre correlação positiva entre a expressão do HLA-G e IL-10, que são fatores imunorreguladores envolvidos na evasão da neoplasia à resposta imunológica do hospedeiro e promotores da progressão tumoral.
- A população de MM2 é maior no microambiente tumoral do MLA que no de MES.
- O maior número de MM2 no MLA ocorre em concordância com as características histopatológicas relacionadas ao pior prognóstico do melanoma, como maior espessura, ulceração e mitoses.

- O número de MM2 intratumorais imunomarcados pelo anticorpo CD206 mostrou-se como o fator de maior poder de associação com o evento metástase.
- Os resultados obtidos sugerem fortemente que as características inerentes ao MLA, como a expressão das moléculas imunomoduladoras HLA-G e IL-10 pelas células neoplásicas, assim como os MM2 do seu microambiente tumoral, são fatores relacionados ao seu comportamento biológico agressivo e de mau prognóstico.

8. ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do projeto de pesquisa - CAPPesq

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

PROJETO DE PESQUISA

Título: EXPRESSÃO DO ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO G E MACRÓFAGOS M2 NO MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL
Pesquisador Responsável: Mírian Nacagami Sotto **Versão:** 1
Pesquisador Executante: Miguel Angel Zúñiga Castillo **CAAE:** 13275313.4.0000.0068
Co-autores: Alice Z. Lobo Siqueira
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 10410

Número do Parecer: 223.487

Data da Relatoria: 20/03/13

Apresentação do Projeto: Estudo retrospectivo onde Os pesquisadores pretendem comparar a expressão do HLA-G e a população de macrófagos M2 em grupos de melanoma lentiginoso acral e melanoma extensivo superficial, verificando se estes fatores estão relacionados com o pior comportamento biológico da forma lentiginosa acral

Objetivo da Pesquisa: Os pesquisadores pretendem comparar a expressão do HLA-G e a população de macrófagos M2 em grupos de melanoma lentiginoso acral e melanoma extensivo superficial, verificando se estes fatores estão relacionados com o pior comportamento biológico da forma lentiginosa acral. Serão utilizadas amostras de melanomas estocadas de 1990 a 2005, sendo utilizadas técnicas de imunohistoquímica

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos envolvidos na pesquisa, sendo um estudo retrospectivo onde serão analisadas amostras de biópsias de casos de melanoma

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: não apresenta questionamentos de natureza ética

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: A apresentação do TCLE fica dispensada por se tratar de pesquisa retrospectiva de material estocado

Recomendações: Aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Aprovado sem pendências

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 21 de Março de 2013

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.tnb
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bradford PT, Goldstein AM, McMaster ML, Tucker MA. Acral lentiginous melanoma: incidence and survival patterns in the United States, 1986-2005. *Arch Dermatol*. 2009;145(4):427-34.
2. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Thompson JF, Long GV, Ross MI, et al. Melanoma of the skin. In: Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al., editors. *AJCC cancer staging manual*. 8 ed. New York, NY: Springer; 2017. p. 563-85.
3. Azoury SC, Lange JR. Epidemiology, risk factors, prevention, and early detection of melanoma. *Surg Clin North Am*. 2014;94(5):945-62, vii.
4. Bristow IR, Acland K. Acral lentiginous melanoma of the foot and ankle: A case series and review of the literature. *J Foot Ankle Res*. 2008;1(1):11.
5. Phan A, Touzet S, Dalle S, Ronger-Savlé S, Balme B, Thomas L. Acral lentiginous melanoma: a clinicoprognostic study of 126 cases. *Br J Dermatol*. 2006;155(3):561-9.
6. Duarte CA, Flórez JP, López HG, Meneses MX, de Vries E. Survival of acral lentiginous melanoma in the National Cancer Institute of Colombia. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016.
7. Ito T, Wada M, Nagae K, Nakano-Nakamura M, Nakahara T, Hagihara A, et al. Acral lentiginous melanoma: who benefits from sentinel lymph node biopsy? *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(1):71-7.
8. Phan A, Touzet S, Dalle S, Ronger-Savlé S, Balme B, Thomas L. Acral lentiginous melanoma: histopathological prognostic features of 121 cases. *Br J Dermatol*. 2007;157(2):311-8.
9. Piliang MP. Acral lentiginous melanoma. *Clin Lab Med*. 2011;31(2):281-8.
10. Tuong W, Cheng LS, Armstrong AW. Melanoma: epidemiology, diagnosis, treatment, and outcomes. *Dermatol Clin*. 2012;30(1):113-24, ix.

11. Chang JW, Yeh KY, Wang CH, Yang TS, Chiang HF, Wei FC, et al. Malignant melanoma in Taiwan: a prognostic study of 181 cases. *Melanoma Res.* 2004;14(6):537-41.
12. Kogushi-Nishi H, Kawasaki J, Kageshita T, Ishihara T, Ihn H. The prevalence of melanocytic nevi on the soles in the Japanese population. *J Am Acad Dermatol.* 2009;60(5):767-71.
13. French JD, Weber ZJ, Fretwell DL, Said S, Klopper JP, Haugen BR. Tumor-associated lymphocytes and increased FoxP3+ regulatory T cell frequency correlate with more aggressive papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2325-33.
14. Pereda C, Traves V, Requena C, Serra-Guillén C, Llombart B, Sanmartín O, et al. Clinical presentation of acral lentiginous melanoma: a descriptive study. *Actas Dermosifiliogr.* 2013;104(3):220-6.
15. Gajewski TF, Meng Y, Harlin H. Immune suppression in the tumor microenvironment. *J Immunother.* 2006;29(3):233-40.
16. RJ R. Acral lentiginous melanoma. In: Hartmann W KS, Reed RJ, editor. *New concepts in surgical pathology of the skin.* New York: Wiley; 1976. p. 89–90.
17. Boriani F, O'Leary F, Tohill M, Orlando A. Acral Lentiginous Melanoma - misdiagnosis, referral delay and 5 years specific survival according to site. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(14):1990-6.
18. Fernandez-Flores A, Cassarino DS. Histopathological diagnosis of acral lentiginous melanoma in early stages. *Ann Diagn Pathol.* 2016.
19. Stubblefield J, Kelly B. Melanoma in non-caucasian populations. *Surg Clin North Am.* 2014;94(5):1115-26, ix.
20. Schulz C, Häfner HM, Breuninger H, Leiter U. [Local recurrence and survival in acral lentiginous melanoma comparing 3D histology and conventional histology]. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2014;12(10):881-90.
21. Kuchelmeister C, Schaumburg-Lever G, Garbe C. Acral cutaneous melanoma in caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients. *Br J Dermatol.* 2000;143(2):275-80.

22. Goydos JS, Shoen SL. Acral Lentiginous Melanoma. In: Kaufman HL, Mehnert JM, editors. *Melanoma*. New Brunswick, NY: Springer; 2016. p. 321-9.
23. Sauter ER, Yeo UC, von Stemm A, Zhu W, Litwin S, Tichansky DS, et al. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Res*. 2002;62(11):3200-6.
24. Jung HJ, Kweon SS, Lee JB, Lee SC, Yun SJ. A clinicopathologic analysis of 177 acral melanomas in Koreans: relevance of spreading pattern and physical stress. *JAMA Dermatol*. 2013;149(11):1281-8.
25. Ibrahim ZA, Narihan MZ, Ojep DN, Soosay AE, Pan KL. Cyclin D1 expression in acral melanoma: a case control study in Sarawak. *Malays J Pathol*. 2012;34(2):89-95.
26. Ishihara K, Saida T, Otsuka F, Yamazaki N, Society PaSICotJSC. Statistical profiles of malignant melanoma and other skin cancers in Japan: 2007 update. *Int J Clin Oncol*. 2008;13(1):33-41.
27. 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.
28. Thompson JF, Soong SJ, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, et al. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol*. 2011;29(16):2199-205.
29. Piris A, Lobo AC, Duncan LM. Melanoma staging: where are we now? *Dermatol Clin*. 2012;30(4):581-92, v.
30. Oucherif O, Naimi D. Function of HLA-G in cancer immunoediting and its clinical benefits. *African Journal of Cancer*. 2015;7(3):132-9.
31. Yie SM, Hu Z. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) as a marker for diagnosis, prognosis and tumor immune escape in human malignancies. *Histol Histopathol*. 2011;26(3):409-20.
32. Urosevic M. HLA-G in the skin--friend or foe? *Semin Cancer Biol*. 2007;17(6):480-4.

33. Fang X, Zhang X, Li J. Up-regulation of human leukocyte antigen G expression in primary cutaneous malignant melanoma associated with host-vs-tumor immune response. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2008;28(2):219-21.
34. Rouas-Freiss N, Marchal RE, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED. The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(10):5249-54.
35. Le Rond S, Gonzalez A, Gonzalez AS, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Indoleamine 2,3 dioxygenase and human leucocyte antigen-G inhibit the T-cell alloproliferative response through two independent pathways. *Immunology.* 2005;116(3):297-307.
36. Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Yamashita T, Miki A, Kikuchi A, et al. Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. *Mol Hum Reprod.* 2001;7(2):195-200.
37. Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, Dausset J, et al. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol.* 1999;11(8):1351-6.
38. Carosella ED. The tolerogenic molecule HLA-G. *Immunol Lett.* 2011;138(1):22-4.
39. Rebmann V, Wagner S, Grosse-Wilde H. HLA-G expression in malignant melanoma. *Semin Cancer Biol.* 2007;17(6):422-9.
40. Le Rond S, Azéma C, Krawice-Radanne I, Durrbach A, Guettier C, Carosella ED, et al. Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/ regulatory T cells. *J Immunol.* 2006;176(5):3266-76.
41. Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carpentier A, Carosella ED. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(21):12150-5.
42. Contini P, Ghio M, Poggi A, Filaci G, Indiveri F, Ferrone S, et al. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol.* 2003;33(1):125-34.

43. Yan WH. Human leukocyte antigen-G in cancer: are they clinically relevant? *Cancer Lett.* 2011;311(2):123-30.
44. Amiot L, Ferrone S, Grosse-Wilde H, Seliger B. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(3):417-31.
45. Sheu J, Shih IM. HLA-G and immune evasion in cancer cells. *J Formos Med Assoc.* 2010;109(4):248-57.
46. Rouas-Freiss N, Moreau P, LeMaout J, Carosella ED. The dual role of HLA-G in cancer. *J Immunol Res.* 2014;2014:359748.
47. Urosevic M, Dummer R. Human leukocyte antigen-G and cancer immunoediting. *Cancer Res.* 2008;68(3):627-30.
48. Curigliano G, Criscitiello C, Gelao L, Goldhirsch A. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). *Clin Cancer Res.* 2013;19(20):5564-71.
49. Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, LeMaout J, Carosella ED. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. *Semin Cancer Biol.* 2007;17(6):413-21.
50. Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett.* 2008;267(2):204-15.
51. Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(3):315-22.
52. Ibrahim EC, Aractingi S, Allory Y, Borrini F, Dupuy A, Duvillard P, et al. Analysis of HLA antigen expression in benign and malignant melanocytic lesions reveals that upregulation of HLA-G expression correlates with malignant transformation, high inflammatory infiltration and HLA-A1 genotype. *Int J Cancer.* 2004;108(2):243-50.
53. González A, Rebmann V, LeMaout J, Horn PA, Carosella ED, Alegre E. The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2012;49(3):63-84.

54. Bezuahly M, Howlett A, Colp P, Conrad DM, Walsh N, Rowden G, et al. Quantitative HLA-G expression in metastasising and non-metastasising primary thin cutaneous melanomas. *Dermatology*. 2008;217(3):281-3.
55. Krüger-Krasagakes S, Krasagakis K, Garbe C, Schmitt E, Hüls C, Blankenstein T, et al. Expression of interleukin 10 in human melanoma. *Br J Cancer*. 1994;70(6):1182-5.
56. Itakura E, Huang RR, Wen DR, Paul E, Wünsch PH, Cochran AJ. IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Mod Pathol*. 2011;24(6):801-9.
57. Chhabra A, Chakraborty NG, Mukherji B. Silencing of endogenous IL-10 in human dendritic cells leads to the generation of an improved CTL response against human melanoma associated antigenic epitope, MART-1 27-35. *Clin Immunol*. 2008;126(3):251-9.
58. Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett*. 2015;367(2):103-7.
59. Boyano MD, Garcia-Vázquez MD, López-Michelena T, Gardeazabal J, Bilbao J, Cañavate ML, et al. Soluble interleukin-2 receptor, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 serum levels in patients with melanoma. *Br J Cancer*. 2000;83(7):847-52.
60. Nemunaitis J, Fong T, Shabe P, Martineau D, Ando D. Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma. *Cancer Invest*. 2001;19(3):239-47.
61. Urosevic M, Dummer R. HLA-G and IL-10 expression in human cancer--different stories with the same message. *Semin Cancer Biol*. 2003;13(5):337-42.
62. Nizar S, Meyer B, Galustian C, Kumar D, Dalglish A. T regulatory cells, the evolution of targeted immunotherapy. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1806(1):7-17.
63. Zhao F, Falk C, Osen W, Kato M, Schadendorf D, Umansky V. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase drives dendritic cells to become tolerogenic in ret transgenic mice spontaneously developing melanoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(13):4382-90.

64. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol*. 1999;11(5):803-11.
65. Terai M, Eto M, Young GD, Berd D, Mastrangelo MJ, Tamura Y, et al. Interleukin 6 mediates production of interleukin 10 in metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(2):145-55.
66. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):162-74.
67. Guruvayoorappan C. Tumor versus tumor-associated macrophages: how hot is the link? *Integr Cancer Ther*. 2008;7(2):90-5.
68. Wang T, Ge Y, Xiao M, Lopez-Coral A, Azuma R, Somasundaram R, et al. Melanoma-derived conditioned media efficiently induce the differentiation of monocytes to macrophages that display a highly invasive gene signature. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012;25(4):493-505.
69. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Høyer M, Maniecki MB, Sjoegren P, et al. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(20):3330-7.
70. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23(11):549-55.
71. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-73.
72. Herwig MC, Grossniklaus HE. Role of macrophages in uveal melanoma. *Expert Rev Ophthalmol*. 2011;6(4):405-7.
73. Domínguez-Soto A, Sierra-Filardi E, Puig-Kröger A, Pérez-Maceda B, Gómez-Aguado F, Corcuera MT, et al. Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin expression on M2-polarized and tumor-associated macrophages is macrophage-CSF dependent and enhanced by tumor-derived IL-6 and IL-10. *J Immunol*. 2011;186(4):2192-200.
74. Takeya M, Komohara Y. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe? *Pathol Int*. 2016;66(9):491-505.

75. Fujimura T, Kakizaki A, Furudate S, Kambayashi Y, Aiba S. Tumor-associated macrophages in skin: How to treat their heterogeneity and plasticity. *J Dermatol Sci.* 2016;83(3):167-73.
76. Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Arch Pharm Res.* 2016;39(11):1588-96.
77. Sica A, Porta C, Riboldi E, Locati M. Convergent pathways of macrophage polarization: The role of B cells. *Eur J Immunol.* 2010;40(8):2131-3.
78. Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(21):4111-26.
79. Bronkhorst IH, Ly LV, Jordanova ES, Vrolijk J, Versluis M, Luyten GP, et al. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(2):643-50.
80. Nguyen TT, Schwartz EJ, West RB, Warnke RA, Arber DA, Natkunam Y. Expression of CD163 (hemoglobin scavenger receptor) in normal tissues, lymphomas, carcinomas, and sarcomas is largely restricted to the monocyte/macrophage lineage. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(5):617-24.
81. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer.* 2006;42(6):717-27.
82. Heusinkveld M, van der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med.* 2011;9:216.
83. Tham M, Tan KW, Keeble J, Wang X, Hubert S, Barron L, et al. Melanoma-initiating cells exploit M2 macrophage TGF β and arginase pathway for survival and proliferation. *Oncotarget.* 2014;5(23):12027-42.
84. Xu L, Zhu Y, Chen L, An H, Zhang W, Wang G, et al. Prognostic value of diametrically polarized tumor-associated macrophages in renal cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2014;21(9):3142-50.
85. Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Szargiej P, Myśliwska J. Different pathways of macrophage activation and polarization. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2015;69:496-502.

86. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 2002;29(6 Suppl 16):15-8.
87. Jung JI, Cho HJ, Jung YJ, Kwon SH, Her S, Choi SS, et al. High-fat diet-induced obesity increases lymphangiogenesis and lymph node metastasis in the B16F10 melanoma allograft model: roles of adipocytes and M2-macrophages. *Int J Cancer.* 2015;136(2):258-70.
88. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel).* 2014;6(3):1670-90.
89. Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:948098.
90. Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE. Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1796(1):11-8.
91. Chávez-Galán L, Ollerios ML, Vesin D, Garcia I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Front Immunol.* 2015;6:263.
92. Fukuda K, Kobayashi A, Watabe K. The role of tumor-associated macrophage in tumor progression. *Front Biosci (Schol Ed).* 2012;4:787-98.
93. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 2006;66(2):605-12.
94. Liu J, Wang L, Gao W, Li L, Cui X, Yang H, et al. Inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 4 was highly expressed in primary ductal and lobular breast cancer and significantly correlated with IL-10. *Diagn Pathol.* 2014;9:85.
95. Herwig MC, Bergstrom C, Wells JR, Höller T, Grossniklaus HE. M2/M1 ratio of tumor associated macrophages and PPAR-gamma expression in uveal melanomas with class 1 and class 2 molecular profiles. *Exp Eye Res.* 2013;107:52-8.
96. Lau SK, Chu PG, Weiss LM. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol.* 2004;122(5):794-801.

97. Doornik JA, Hansen H. An Omnibus Test for Univariate and Multivariate Normality. *Oxford Bulletin of Economics and Statistics*. 2008;70:927-39.
98. Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA, et al. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(8):4510-5.
99. Cabestre FA, Lefebvre S, Moreau P, Rouas-Friess N, Dausset J, Carosella ED, et al. HLA-G expression: immune privilege for tumour cells? *Semin Cancer Biol*. 1999;9(1):27-36.
100. Adrián Cabestré F, Moreau P, Riteau B, Ibrahim EC, Le Danff C, Dausset J, et al. HLA-G expression in human melanoma cells: protection from NK cytotoxicity. *J Reprod Immunol*. 1999;43(2):183-93.
101. Paul P, Cabestré FA, Le Gal FA, Khalil-Daher I, Le Danff C, Schmid M, et al. Heterogeneity of HLA-G gene transcription and protein expression in malignant melanoma biopsies. *Cancer Res*. 1999;59(8):1954-60.
102. Coit DG, Thompson JA, Algazi A, Andtbacka R, Bichakjian CK, Carson WE, et al. Melanoma, Version 2.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016;14(4):450-73.
103. Ugurel S, Rebmann V, Ferrone S, Tilgen W, Grosse-Wilde H, Reinhold U. Soluble human leukocyte antigen-G serum level is elevated in melanoma patients and is further increased by interferon-alpha immunotherapy. *Cancer*. 2001;92(2):369-76.
104. Neagu M, Constantin C, Zurac S. Immune parameters in the prognosis and therapy monitoring of cutaneous melanoma patients: experience, role, and limitations. *Biomed Res Int*. 2013;2013:107940.
105. Kucera R, Topolcan O, Treskova I, Kinkorova J, Windrichova J, Fuchsova R, et al. Evaluation of IL-2, IL-6, IL-8 and IL-10 in Malignant Melanoma Diagnostics. *Anticancer Res*. 2015;35(6):3537-41.
106. Wiguna AP, Walden P. Role of IL-10 and TGF- β in melanoma. *Exp Dermatol*. 2015;24(3):209-14.
107. Dummer W, Becker JC, Schwaaf A, Leverkus M, Moll T, Bröcker EB. Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res*. 1995;5(1):67-8.

108. Ly LV, Baghat A, Versluis M, Jordanova ES, Luyten GP, van Rooijen N, et al. In aged mice, outgrowth of intraocular melanoma depends on proangiogenic M2-type macrophages. *J Immunol.* 2010;185(6):3481-8.
109. Varney ML, Johansson SL, Singh RK. Tumour-associated macrophage infiltration, neovascularization and aggressiveness in malignant melanoma: role of monocyte chemotactic protein-1 and vascular endothelial growth factor-A. *Melanoma Res.* 2005;15(5):417-25.
110. Shi L, Lei D, Ma C, Xu F, Li Y, Wang Y, et al. Clinicopathological implications of tumour-associated macrophages and vascularization in sinonasal melanoma. *J Int Med Res.* 2010;38(4):1276-86.
111. Storr SJ, Safuan S, Mitra A, Elliott F, Walker C, Vasko MJ, et al. Objective assessment of blood and lymphatic vessel invasion and association with macrophage infiltration in cutaneous melanoma. *Mod Pathol.* 2012;25(4):493-504.
112. Emri E, Egervari K, Varvolgyi T, Rozsa D, Miko E, Dezso B, et al. Correlation among metallothionein expression, intratumoural macrophage infiltration and the risk of metastasis in human cutaneous malignant melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013;27(3):e320-7.