

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
FACULDADE DE MEDICINA

JÉFERSON KRAWCYK DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DA LESÃO
PRIMÁRIA COMO FATOR PREDITIVO DE POSITIVIDADE DE LINFONODO
SENTINELA EM MELANOMA MALIGNO CUTÂNEO**

Porto Alegre

2009

JÉFERSON KRAWCYK DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DA LESÃO PRIMÁRIA COMO FATOR PREDITIVO DE POSITIVIDADE DE LINFONODO SENTINELA EM MELANOMA MALIGNO CUTÂNEO

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador : Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva

Porto Alegre

2009

Dedico este trabalho a meus pais, responsáveis pelo aprendizado dos preceitos morais e éticos que norteiam minha vida, à minha esposa, base emocional essencial para que fosse possível resistir em horas de dificuldade, a meu orientador, responsável pelo aprendizado dos conhecimentos necessários para que pudesse realizar este trabalho, ao Dr. Antônio Carlos Milano do Canto, que ao longo desta trajetória me oportunizou o conhecimento cirúrgico necessário.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os funcionários do Hospital São Lucas da PUCRS, em especial aos funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica, que, ao demandarem parte de seu tempo na ajuda a coleta de dados, não só me demonstraram o significado da palavra competência, mas também da palavra amizade.

“A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade”.

Julio Verne

RESUMO

OLIVEIRA, JK. TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DA LESÃO PRIMÁRIA COMO FATOR PREDITOR DE POSITIVIDADE DE LINFONODO SENTINELA EM MELANOMA MALIGNO CUTÂNEO

O melanoma maligno cutâneo se encontra entre as neoplasias que mais aumentam em incidência anual no mundo. Vários fatores vêm sendo estudados na determinação de prognóstico, entre eles, a espessura de Breslow, os níveis de Clark, a presença de ulceração e a *taxa de proliferação celular*. Esta última vem ganhando importância nas últimas publicações, como um fator capaz de determinar a positividade de linfonodo sentinela, além do prognóstico. Pouco tem sido estudado, no entanto, seu papel enquanto variável isolada. Este trabalho tem por objetivo estudar a existência de relação preditora entre a Taxa de Proliferação Celular (TPC) e a Positividade do Linfonodo Sentinela (PLS). Foi realizado, para tanto, estudo transversal envolvendo a avaliação dos exames anatomopatológicos de 109 pacientes atendidos pelo Programa Melanoma do HSL-PUCRS no período de Outubro de 2006 até Outubro de 2008. Foi realizado teste de Chi-Quadrado e Regressão Logística Binária visando identificação de variável com capacidade preditora de desfecho, ou seja, Positividade ou Negatividade de Linfonodo Sentinela. As variáveis que demonstraram valor independente em relação ao desfecho foram a Espessura de Breslow ($p = 0,001$) e Níveis de Clark ($p = 0,047$). A Taxa de proliferação celular apresentou relação inferior a 5%, com o valor de “ p ” mais próximo do desejado ($p = 0,07$) em pacientes com Breslow 1-2 mm e idade inferior a 40 anos. Em conclusão, o taxa de proliferação celular dos melanomas malignos cutâneos não mostrou relação com o desfecho pretendido enquanto variável

independente.. Este fenômeno estatístico nos leva a crer que a TPC é o que chamamos de *variável de grupo*, ou seja, contribui junto com um grupo de variáveis para um determinado desfecho. É possível que, em um grupo selecionado de pacientes com espessura intermediária (1-2mm) e idade jovem (abaixo de 40 anos), se possa prever a positividade ou não de um gânglio previamente a realização de pesquisa de linfonodo sentinela.

Palavras-chave : Melanoma. Taxa de Proliferação Celular. Linfonodo Sentinela

ABSTRACT

OLIVEIRA, JK. EVALUATION OF CELL PROLIFERATION RATE OF THE PRIMARY LESION AS A PREDICTION FACTOR FOR THE POSITIVITY OF SENTINEL LYMPH NODE IN CUTANEOUS MALIGNANT MELANOMA

Cutaneous malignant melanoma(CMM) currently ranks among the neoplasms with the highest increasing annual incidence rates in the world. Several factors are under scrutiny to serve as prognostic markers of cmm such as Breslow thickness, Clark levels, presence of ulceration and cell proliferation rate. The former has received especial relevance in the last studies published as an useful factor to determine positivity of the sentinel lymph node. Nevertheless, its potencial as an isolated variable has not been thoroughly appreciated. The aim of this study was to explore possible relations between Cellular Proliferation Rate (CPR) and Sentinel Lymph Node (SLN) positivity. It was performed, for instance, a transversal study involving consecutive biopsies of 109 patients enrolled in the Melanoma Program of HSL- PUCRS between October 2006 and November 2008 . Chi- square test and Binary Logistic Regression (BLR) were used to assess potential predictive variables for patient outcome, that is positivity or negativity of SLN biopsy. Breslow thickness ($p= 0,004$) and Clark levels ($p= 0,047$) showed independent value for outcome in patients under the age of 40 years with Breslow thickness between 1-2 mm. The Cellular Proliferation Rate showed a close relation with the

expected outcome when BLR was performed with an association of 0,7%.
CPR may eventually prove itself as an independent variable in a group of selected patients with intermediate Breslow thickness and young age (under 40 years).

Key words : Melanoma. Cellular Proliferation Rate. Sentinel Lymph Node

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Taxas de variação de incidência anual para os principais tipos de tumor a partir dos dados do SEER, calculados pelo NCI.....	15
Figura 2. Núcleos Celulares em divisão corados pelo marcador Ki 67	21
Gráfico 1. Distribuição da variável Taxa de Proliferação Celular nos pacientes submetidos a PLS	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características de distribuição das variáveis contínuas.....	27
Tabela 2	Características de distribuição das variáveis categóricas	28
Tabela 3.	Análise Univariada através do Chi-quadrado.....	29
Tabela 4.	Comparação entre os grupos pelo teste de Wilcoxon.....	30
Tabela 5.	Regressão Logística Binária.....	31
Tabela 6.	Comparação entre TPC e LS categorizado por Breslow e Idade.....	32
Tabela 7.	significância do TPC como variável contínua categorizando-se por Breslow e Idade.....	33
Tabela 8.	Categorização por $TPC > 9 <$ mitoses (Teste X^2 e Correlação).....	33
Tabela 9.	Teste de X^2 e Índice de Correlação (Taxa de proliferação celular $> 6 <$ mitoses/ mm^2).....	34
Tabela 10.	Regressão Logística nos pacientes submetidos a PLS e com idade Inferior a 40 anos.....	35
Tabela 11.	Variáveis Incluídas na equação utilizando-se o método <i>ENTER</i>	35
Tabela 12.	Regressão Logística nos pacientes submetidos a PLS e com idade inferior a 40 anos.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AJCC	American Joint Comitee on Cancer
BLR	Binary Logistic Regression
CIOMS	<i>Council for International Organizations of Medical Sciences</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CPR	Cellular Proliferation Rate
DP	Desvio Padrão
GBM	Grupo Brasileiro de Melanoma
IM	Índice Mitótico
IMVC	Índice Mitótico Volume- Corrigido
JWCI	John Wayne Câncer Institute
TPC	Taxa de Proliferação Celular
LDH	Desidrogenase Láctica
LS	Linfonodo Sentinela
mm ²	Milímetro Quadrado
MMC	Melanoma Maligno Cutâneo
MSLT-I	Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial
NCI	National Cancer Institute
PLS	Pesquisa de Linfonodo Sentinela
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RLB	Regressão Logística Binária
SEER	Surveillance Epidemiology and End Result
UV- A	Ultravioleta A
X ²	Qui- quadrado

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE QUADROS E TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2.OBJETIVOS.....	17
3.MÉTODOS.....	18
3.1 Delineamento ,população e amostra.....	18
3.2 Critérios de Inclusão.....	19
3.3 Critérios de Exclusão.....	19
3.4 Variáveis em Estudo.....	19
3.5 Revisão Anatomopatológica.....	24
3.6 Análise Estatística.....	24
3.7 Ética.....	25
4.RESULTADOS.....	26
4.1 Taxa de proliferação celular.....	31
5. DISCUSSÃO.....	37
5.CONCLUSÕES.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

1 INTRODUÇÃO :

O melanoma maligno cutâneo (MMC) é um tumor maligno originado nos melanócitos, células produtoras de melanina, que promovem a coloração da pele (Melanoma Statistics; Cancer, 2008). Desde os primeiros estudos, publicados na década de 60, sua incidência tem aumentado em 3 a 8% ao ano, correspondendo a 4% dos tumores cutâneos nos EUA (Retsas, 2005) e sendo o oitavo tumor em frequência nos Estados Unidos da América (Govindarajan, Ghazarian *et al.*, 2007). Apesar de sua incidência não tão alta o MMC é responsável por 75% das mortes por câncer de pele (Cook, 2004). As estatísticas do Instituto Nacional do Câncer dos EUA demonstram que o melanoma é o tumor com o segundo maior aumento de mortalidade entre pacientes acima de 65 anos (Balch, Soong *et al.*, 2001). Este aumento de incidência elevou o melanoma cutâneo a um dos cinco tumores que mais crescem em incidência no mundo (Figura 1.), e afeta hoje, aproximadamente 33000 homens e 26000 mulheres nos Estados Unidos da América (Results, 2008). No Brasil, as estatísticas são mais modestas com uma incidência anual aproximada de 2.950 casos novos em homens e 2.970 em mulheres (Cancer, 2008).

Apesar do aumento em incidência e de um pretendo aumento de mortalidade geral, sua sobrevivência vem apresentando alguma melhora. Nos anos sessenta, 60% dos pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo morriam pela doença, contra 11% observados nas últimas estatísticas (Retsas, 2005).

Vários fatores têm sido associados a risco de desenvolver a doença, destacando-se a história familiar, presença de múltiplos e atípicos nevos, história prévia de melanoma, imunossupressão e sensibilidade ao sol, em especial aos raios UV-A (Miller e Mihm, 2006).

O tratamento principal das lesões melanocíticas é através da excisão cirúrgica ampla, que envolve a definição de margens cirúrgicas livres, ainda hoje motivo de controvérsia. Basicamente, nas lesões com espessura igual ou inferior a 1mm, as margens cirúrgicas laterais e profunda devem ser de 1cm. Para as lesões com espessura superior, a

margem mínima recomendada corresponde a 2cm(Thompson, Uren *et al.*, 2003a).

Após tratada a lesão primária, o fator prognóstico isolado mais importante é o estado de comprometimento, ou não, da drenagem linfática peritumoral(Morton, Cochran *et al.*, 2005; Van Akkooi, De Wilt *et al.*, 2006; Chakera, Hansen *et al.*, 2008), ou seja, vasos linfáticos com capacidade de transportar células malignas do tumor para nódulos linfáticos e, em última análise, à distância(Thompson e Uren, 2005).A sobrevida em 5 anos dos pacientes com metástase ganglionar aparente é de 20%, em comparação com 50% em pacientes sem este acometimento(Brady, 2004).

O estudo do comprometimento linfático no melanoma cutâneo ocorria, desde 1892, seguindo as recomendações de Snow, via esvaziamento ganglionar eletivo de todos os pacientes acometidos. Em teoria, se a metastatização do melanoma progredia sequencialmente do sítio primário até o linfonodo regional e, a partir daí, para locais mais distantes, a remoção precoce destes linfonodos poderia interromper esta cascata. Estas teorias eram embasadas em estudos realizados por Sappey no final do século XIX e aplicadas até meados da década de 70. Pelo menos três trabalhos demonstraram não existir benefícios, em termos de sobrevida, nos pacientes submetidos a esvaziamento ganglionar eletivo(Morton, Thompson *et al.*, 1999). Além disso, eram tratados incorretamente pelo menos 30% dos casos(Thompson e Uren, 2005). Estas teorias tiveram sua principal mudança na década de 90 quando começou a ser desenvolvido o conceito de *Pesquisa de Linfonodo Sentinela (PLS)* (Thompson, Uren *et al.*, 2003b; Thompson e Uren, 2005).

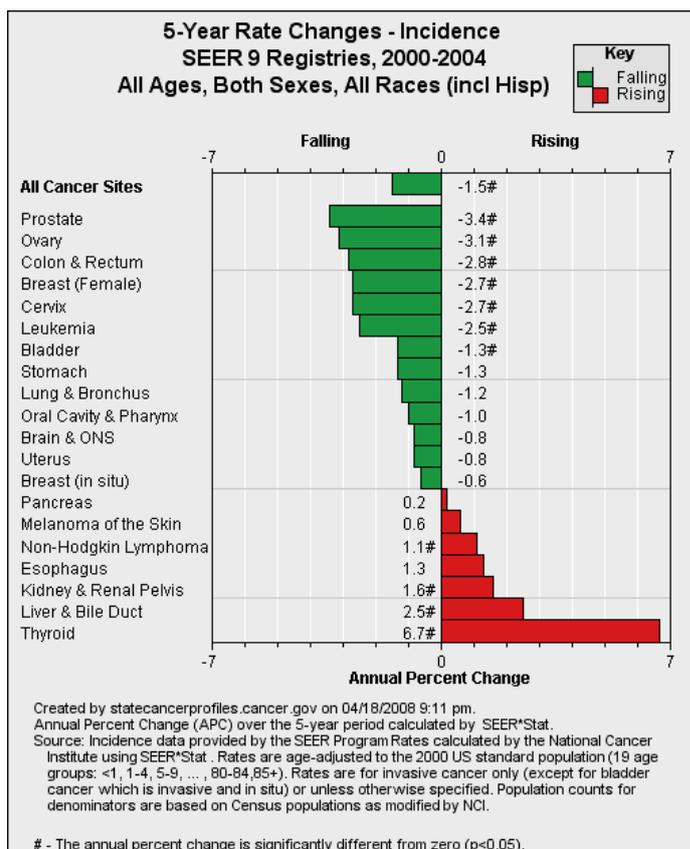


Figura 1. Taxas de variação de incidência anual para os principais tipos de tumor a partir dos dados do SEER, calculados pelo NCI.

Fonte : Surveillance Epidemiology and End Result (SEER)(Results, 2008).

O Linfonodo Sentinela corresponde ao primeiro linfonodo, ou qualquer linfonodo que receba drenagem direta de qualquer tipo de neoplasia maligna(Yee, Thompson *et al.*, 2005). Os primeiros trabalhos, em relação ao seu estudo, iniciaram em meados da década de 90, seguindo as teorias de Morton (Morton, Wen *et al.*, 1992). A justificativa teórica para o uso da PLS baseia-se na tentativa de diminuição de morbidade cirúrgica ao se evitar um esvaziamento ganglionar eletivo, além de melhorar a acurácia em relação ao *status* linfonodal. A técnica é realizada através da injeção perilesional de radiocontraste. Este último, ao migrar pela cadeia linfática correspondente a drenagem daquela região, proporciona o mapeamento indireto da mesma e a conseqüente identificação do primeiro linfonodo de drenagem, processo conhecido como *Linfocintigrafia* (Morton, Wen *et al.*, 1992; Morton, Cochran *et al.*, 2005).

Uma vez realizada a Linfocintigrafia, o linfonodo identificado como Linfonodo Sentinela é submetido a biópsia excisional. Em até 20% dos casos, o Linfonodo Sentinela é positivo para células do melanoma (Mraz-Gernhard, Sagebiel *et al.*, 1998) ⁷. Estes pacientes que apresentaram teste positivo serão submetidos a esvaziamento ganglionar completo. Os outros 80%, outrora submetidos a procedimento de maior morbidade, serão poupados de nova intervenção cirúrgica (Patel, Coit *et al.*, 2002; Morton, Cochran *et al.*, 2005; Thompson, Scolyer *et al.*, 2005; Govindarajan, Ghazarian *et al.*, 2007).

Dentre os possíveis fatores preditores para positividade de células malignas em linfonodo sentinela de MMC destacam-se a *espessura da lesão* (Breslow), *ulceração*, *níveis de Clark* (IV/V), *localização axial*, *fase vertical de crescimento*, *idade jovem* e ***taxa de proliferação celular(TPC)*** das lesões primárias (Mraz-Gernhard, Sagebiel *et al.*, 1998; Thompson e Shaw, 2004; Kesmodel, Karakousis *et al.*, 2005; Kruper, Spitz *et al.*, 2006; Paek, Griffith *et al.*, 2007; Taylor, Patel *et al.*, 2007; Sassen, Shaw *et al.*, 2008). O TPC tem sido relacionado a predição de positividade de linfonodo sentinela, principalmente, nos melanomas ditos finos, ou seja, aqueles com espessura de Breslow < 1mm (Kesmodel, Karakousis *et al.*, 2005; Kruper, Spitz *et al.*, 2006; Paek, Griffith *et al.*, 2007; Sassen, Shaw *et al.*, 2008). Seu significado tem sido relacionado também ao prognóstico geral dos melanomas, além das características primárias da lesão. O TPC é medido através do número de mitoses identificados em uma amostra tecidual de tumor em um milímetro quadrado, ou através do antígeno Ki-67, medido em termos de percentual de positividade em relação ao resto da amostra tecidual (Karjalainen, Eskelinen *et al.*, 1998; Mraz-Gernhard, Sagebiel *et al.*, 1998). Este último, que será melhor esclarecido adiante em método, é um marcador imunohistoquímico que identifica células em divisão.

Neste trabalho serão abordados e estudados conceitos e concepções que envolvem o estágio clínico do melanoma maligno cutâneo, principalmente no que tange as variáveis taxa de proliferação celular do MMC e positividade do Linfonodo Sentinela (LS).

2 OBJETIVOS:

- 1) Determinar a aplicabilidade do Taxa de proliferação celular da lesão primária como fator preditor de positividade do linfonodo sentinela no melanoma maligno cutâneo.

- 2) Estudar as demais características da lesão melanocítica primária e suas relações com a positividade do linfonodo sentinela.

3 MÉTODOS :

3.1 Delineamento, população e amostra

Para a realização do presente trabalho, foi desenvolvido estudo transversal através da análise de dados retrospectivos, coletados prospectivamente pelo Programa Melanoma do Hospital São Lucas da PUCRS, envolvendo uma amostra de pacientes com diagnóstico de melanoma maligno cutâneo, no período que compreendeu os meses de Outubro de 2006 até Novembro de 2008 e submetidos a pesquisa de linfonodo sentinela (PLS) .

As características da lesão primária do melanoma maligno cutâneo, bem como a positividade, ou negatividade, do linfonodo sentinela, foram obtidas através da análise dos laudos de exame anatomopatológicos fornecidos pelo Laboratório de Anatomia Patológica do HSL-PUCRS.

Tais laudos são fornecidos, rotineiramente, a partir da análise de amostras de tecido neoplásico, armazenadas no Laboratório de Anatomia Patológica do HSL-PUCRS sob a forma de blocos de parafina.

Tais blocos são preparados sob a forma de lâminas de seis micrômetros de espessura, coradas pela hematoxilina- eosina e marcador imuno-histoquímico Ki 67 .

As informações, advindas do estudo de tais lâminas, são anexadas a descrição macroscópica e microscópica da peça cirúrgica visando a informação do médico assistente quanto às características necessárias para definição de prognóstico e tratamento.

As variáveis idade, sexo, cor, localização da lesão, estadiamento e dosagem de Lactato Desidrogenase (LDH) foram obtidas através do banco de dados do Programa Melanoma do Hospital São Lucas da PUCRS.

As características que não puderam ser definidas, conforme proposto acima, foram acessadas por revisão de prontuário.

3.2 Critérios de Inclusão

Foram incluídos os pacientes com diagnóstico prévio de melanoma maligno cutâneo e submetidos a pesquisa de linfonodo sentinela, atendidos no Serviço de Cirurgia Geral do Hospital São Lucas da PUCRS, no período de Outubro de 2006 até Novembro de 2008.

3.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes cujas características da lesão primária não puderam ser acessadas pelas revisões de exame anatomopatológico, banco de dados ou prontuário. Também foram excluídos aqueles pacientes submetidos a excisão da lesão primária com margem superior a 3cm, o que poderia destruir o complexo linfático ao redor da lesão, prejudicando a migração do contraste na cadeia linfática e, conseqüentemente, o achados do linfonodo sentinela.

3.4 Variáveis em Estudo

As variáveis analisadas em relação a positividade de linfonodo em pacientes submetidos a pesquisa de linfonodo sentinela foram :

- Idade

Tomada tanto como variável contínua quanto categorizada pela média em acima ou abaixo de cinqüenta e cinco anos. Outra categoria utilizada foi em acima ou abaixo de 40 anos , baseada em trabalhos prévios como os de Thompson & Shaw (Thompson e Shaw, 2004), que utilizaram a mesma divisão.

- Sexo

Tomada como masculino e feminino

- Cor

Categorizada nos grupos branca , negra e asiática.

- Taxa de proliferação celular

O TPC foi definido, neste trabalho, como o número de mitoses por milímetro quadrado e avaliado através de exame imuno-histoquímico com o marcador Ki67, contando com uma associação das técnicas descritas na introdução (página 16, linha 23).

O Ki 67 é um marcador de reação antígeno-anticorpo que não está expresso nas células em descanso, porém que promove coloração acastanhada nas células que se encontram em metade da fase G1, fase S ,fase G2 e M do ciclo celular (Pearl, Pacifico *et al.*, 2007).

Para a leitura das lâminas submetidas ao método imuno-histoquímico, foi utilizado o método de captura de imagem das áreas com aparente maior número de mitoses por mm², também chamados “hot spots”. Após a identificação dessas áreas, foi realizada captura de imagem através do sistema óptico Zeiss Axioskop 40 (Oberkohen, Alemanha), com lentes neofluares, conectados através de videocâmera Roper Scientific (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) a um computador Pentium D820 Ghz com 1024 MB de memória RAM, disco rígido de 250 GB e placa de captura Image Pro Capture Kit (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) e analisadas através do programa Image Pro Plus 4.5.

A contagem do número de mitoses foi realizada após magnificação da imagem em 400X (1312 X 1040 pixels) correspondendo a uma área aproximada de 0,76 mm². As células em mitose foram identificadas pela coloração marrom. Foi realizada inserção de grade de correção conforme preconizado por Gundersen *et al.* , sendo

consideradas, para contagem, as células dentro da área grade e que não tocassem a linha pontilhada, conforme demonstrado na Figura 2 .

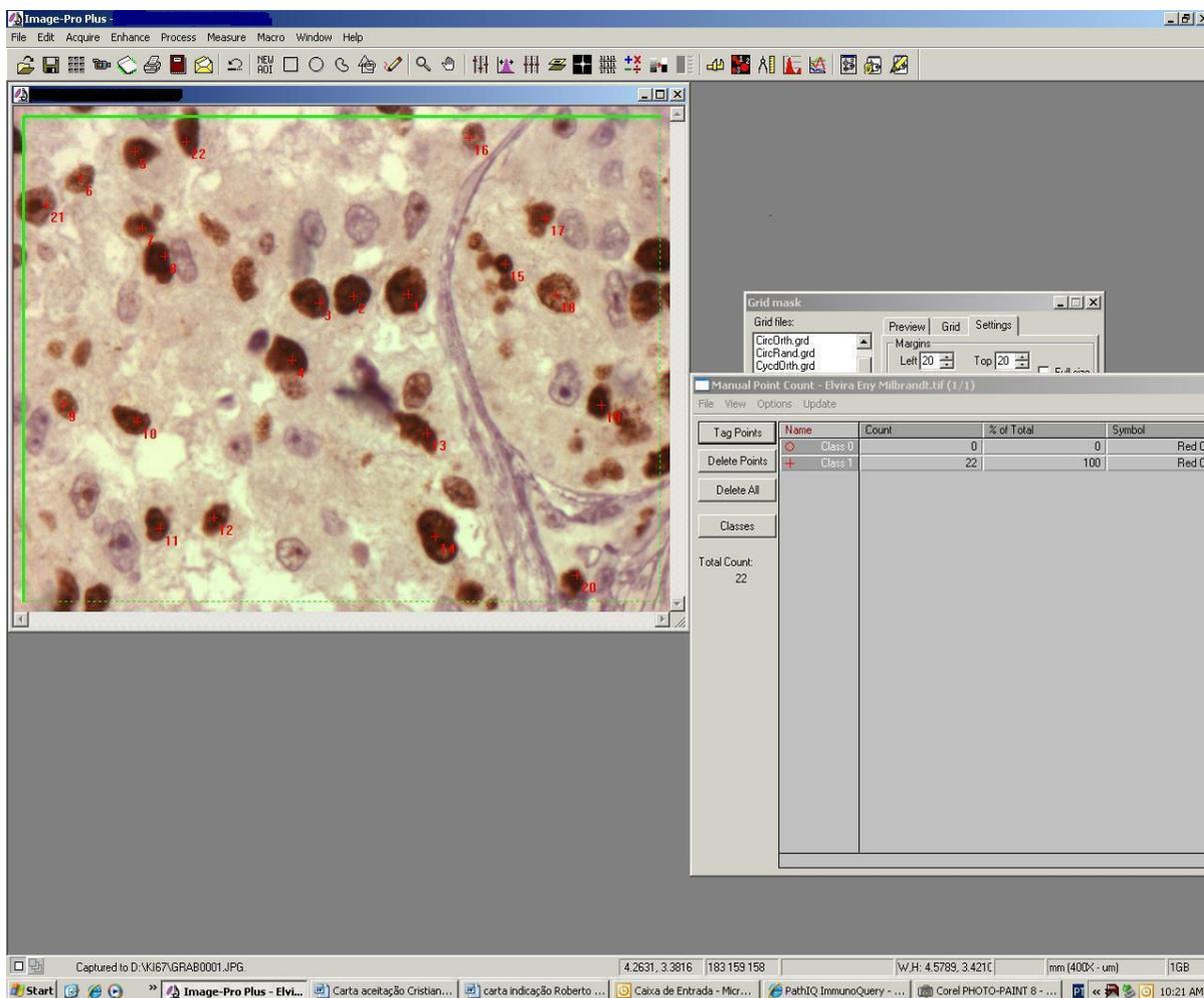


Figura 2. Núcleos Celulares em divisão corados pelo marcador Ki 67 ..

O TPC foi avaliado como variável contínua ou dividido nas categorias > 6 mitoses/ mm^2 ou < 6 mitoses/ mm^2 e > 9 mitoses/ mm^2 e < 9 mitoses/ mm^2 . A divisão em seis mitoses seguiu a descrição original de Clark (Crowson, Magro *et al.*, 2006) e foi coincidente com a mediana. As demais divisões seguiram a média e o desvio padrão.

- Localização da Lesão

As localizações utilizadas foram : couro cabeludo, face, tronco, membros superiores, membros inferiores, mãos, pés e pescoço.

- Espessura de Breslow

A espessura de Breslow, definida por Alexander Breslow, em 1970 (Breslow, 1970), como a espessura do tumor desde o topo da camada granular na epiderme, ou a base da lesão ulcerada, até o ponto mais profundo da lesão, mensurado em ângulo reto com a epiderme; foi tomada em milímetros e analisada tanto como variável contínua quanto categórica, seguindo os critérios do AJCC.

- Níveis de Clark

Os níveis de invasão de Clark foram mensurados seguindo a descrição de Wallace Clark de 1969 (Clark, From *et al.*, 1969), sendo Clark I a lesão que invade apenas epiderme, Clark II aquela que invade a derme papilar (não apresenta anexos), Clark III aquela que invade a derme reticular (com anexos) Clark IV aquela que se estende até a hipoderme e Clark V aquela que invade maciçamente a hipoderme .

- Histologia

O tipos histológicos foram definidos como tipo Disseminação Superficial, Nodular, Lentigo Maligno, Acral e Desmoplásico.

- Ulceração

Definido como a presença de solução de contigüidade .

- Linfonodo Sentinela

Definido como positivo, se presença de células tumorais de melanoma no linfonodo, e negativo, se ausência de células de melanoma no linfonodo. Os critérios para realização da PLS estão em acordo com a normatização do Grupo Brasileiro de Melanoma (GBM) e são : tumores com espessura superior a 0,75mm ou inferior a 0,75mm , mas que apresentem critérios de mau prognóstico como ulceração ou níveis de Clark IV e V . Os linfonodos considerados negativos pelo exame do HE foram submetidos a confirmação através do exame imuno-histoquímico com os marcadores HMB-45 e proteína S-100.

O método utilizado para PLS foi a combinação de linfocintigrafia com 2ml fitato marcado com Tc^{99m} e injeção perilesional, no centro cirúrgico, de 2ml da coloração com Azul Patente. Foi considerado sentinela o linfonodo que apresentasse coloração azul ou atividade radiativa de pelo menos 10% do sítio com maior nível de radiação.(McMasters, Wong *et al.*, 2001; Doubrovsky, De Wilt *et al.*, 2004; Kesmodel, Karakousis *et al.*, 2005; Kruper, Spitz *et al.*, 2006; Govindarajan, Ghazarian *et al.*, 2007)

- Imuno-histoquímica

A partir dos tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina das peças tumorais selecionadas, cortes com espessura de 3 μ m serão submetidos à recuperação antigênica em microondas por 20 minutos, utilizando tampão citrato, pH 6 (10 mM). O bloqueio da peroxidase endógena será feito utilizando-se solução de peridrol a 3% (H₂O₂ em álcool metílico) por 30 minutos. Os cortes serão imersos em solução de leite em pó desnatado a 5% em tampão PBS (“Phosphate-binding saline”) por 30 minutos para diminuir a coloração de fundo (background). As secções serão incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Ki67 (Clone MM1, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK) com

diluição de 1:250. O sistema de detecção utilizado será o Kit HRP Polymer Max (Zymed, Invitrogen, USA), seguindo orientação do fabricante. Os cortes serão revelados usando-se cromógeno 3,3'-diaminoazobenzidina (DAB+)(Dako, Denmark) e contracorados com hematoxilina, sendo desidratados, clarificados e, finalmente, montados com bálsamo e lamínula.

- LDH

Definido como a dosagem de *Desidrogenase Láctica* no sangue periférico. Seu significado tem sido associado a piora do prognóstico quando de alto valor aferido. Na amostra aferida, a variável foi testada como variável contínua e testada com divisões por média e desvio padrão, gerando as categorias : até 150 UI/dl , 150-292 UI/dl, 292-434 UI/dl, 434-576 UI/dl, 576-718 UI/dl e 718-860 UI/dl.

3.5 Revisão Anatomopatológica

A revisão das lâminas correspondentes a lesão primária, bem como do linfonodo sentinela e a taxa de proliferação celular, foi realizada pelo mesmo médico patologista, que não apresentava envolvimento com o projeto de pesquisa e não sabia dos resultados do LS.

3.6 Análise Estatística

Foi realizada análise descritiva em todas as variáveis, sendo realizado teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov nas variáveis contínuas. Nenhuma das variáveis apresentou distribuição normal, sendo, portanto, comparadas ao desfecho Positividade do Linfonodo Sentinela por teste de Qui-quadrado. Todas as variáveis foram divididas em dois grupos levando em consideração o desfecho. Estes grupos foram

comparados pelo teste de Wilcoxon, visando avaliação de possíveis vieses de seleção.

As variáveis que apresentaram significância estatística no teste de X^2 , definida por P inferior a 0,05, foram alocadas para participação no módulo de Regressão Logística Binominal pelo método Forward Stepwise Conditional (Cox, 1972), visando definição de contribuição independente das características para o desfecho. A RBL é uma técnica estatística que tem por objetivo regressar os elementos de uma equação à média e, com isso, tentar definir relação de causalidade entre vários fatores e um desfecho pretendido, sendo possível ainda ser atribuídos pesos específicos nesta determinação.

As variáveis numéricas idade, Breslow e Taxa de proliferação celular foram analisadas tanto de maneira contínua quanto divididas em categorias, conforme já descrito em métodos.

O TPC foi alocado obrigatoriamente no quadro de variáveis candidatas a predição do desfecho na análise multivariada, mesmo que não apresentasse relação significativa na análise univariada.

Todas as análises, gráficos e tabelas foram realizadas através dos programas Microsoft Excel 2003 e SPSS v. 13.0 para windows.

O nível de significância adotado foi de 5% ($P < 0,05$).

3.7 Ética

Este estudo encontra-se em conformidade com os itens III.3.i e III.3.t das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96), bem como a diretriz 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas envolvendo Seres Humanos (CIOMS 1993), sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob o protocolo de número CEP 08/04235.

4. RESULTADOS

Cento e nove paciente, no período que compreendeu Outubro de 2006 a Novembro e 2008, foram tratados, pelo Programa Melanoma do Hospital São Lucas da PUCRS. Destes, foi possível obter informações completas em 105 pacientes, que constituíram a amostra final em estudo. As características gerais de distribuição da amostra estão resumidas nas tabelas 1, 2 e 3 . Cinquenta e sete pacientes (54,3%) foram submetidos a pesquisa de linfonodo sentinela, seguindo os critérios do Grupo Brasileiro de Melanoma(GBM), ou seja, apresentar espessura de Breslow acima de 0,75mm ou abaixo de 0,75mm mas com critérios de gravidade tais como níveis de Clark em IV ou V, ou presença de ulceração. Nove pacientes (15,8%) foram positivos. A média de idade foi de 53,2 anos (DP= 15,72), sendo o mais novo vinte e cinco anos e o mais velho noventa anos . Sessenta e cinco pacientes (61,9%) pertenciam ao sexo feminino e quarenta (38,1%) ao sexo masculino. Em relação a cor da pele, cento e um pacientes (96,2%) pertenciam a cor branca, enquanto que dois pacientes (1,9 %) eram afro-brasileiros e dois pacientes (0,9 %) a etnia asiática. A localização mais freqüente das lesões foi o tronco (52,3 %). Quarenta e um (39 %) apresentavam espessura de Breslow até 1mm. Os outros sessenta e um por cento dividiam-se em 1-2 mm (10,5%), 2-4 mm (25,7 %) e > 4mm (24,8 %). Quatro pacientes (3,8 %), pertenciam a categoria Clark I , sendo o mais freqüente o Clark IV (32,8 %).

O tipo histológico mais prevalente foi o espalhamento superficial, representando cinquenta e cinco (52,5%) de 105 pacientes válidos. A maioria dos pacientes (67 %), apresentavam lesão não ulcerada .

A média do LDH, coletado pré- operatoriamente, foi de 434,44 UI/ dl (DP = 142 UI/ dl).

A maioria dos pacientes foi procedente da região metropolitana (52,8 %), seguida pela região serrana (17%).

Tabela 1. Características de distribuição das variáveis contínuas.

	Idade(anos)	Breslow(mm)	Taxa de proliferação celular (mitoses/mm ²)	LDHPré Operatório (UI/dl)
Média	53,20	3,41	9,60	434,44
DP	15,72	4,17	10,36	142
Assimetria	,057	2,46	1,41	,421
Curtose	-,782	7,80	1,08	1,92
Mínimo	25	,00	0	128
Maximo	90	25,00	43	959

Tabela 2. Características de distribuição das variáveis categóricas.

Característica		Frequência(n)	Percentual (%)
Sexo(n=105)	Masculino	40	38,1
	Feminino	65	61,9
	Total	105	100,0
Cor(n= 105)	Negro	2	1,9
	Branco	101	96,2
	Asiático	2	1,9
Local(n= 105)	C. Cabeludo	3	2,8
	Face	3	2,8
	Tronco	55	52,3
	MsSup.	13	12,4
	Ms Inf	21	20,0
	Mãos	1	0,95
	Pés	7	6,55
	Pescoço	2	1,9
Breslow(n= 105)	Até 1mm	41	39,0
	1-2 mm	11	10,5
	2-4mm	27	25,7
	> 4mm	26	24,8
Clark (n= 105)	I	4	3,8
	II	27	25,2
	III	28	25,7
	IV	34	32,4
	V	12	12,9
	Total	105	100,0
Histologia (n= 105)	Nodular	35	33,3
	Esp. Superficial	55	52,4
	Lentigo Maligna	5	4,8
	Acral	10	9,5
	Total	104	100,0
Ulceração (n= 105)	Ulcerado	34	32,4
	Ñ Ulcerado	71	67,6

Tabela 3. Distribuição Conforme Linfonodo Sentinela

Sentinela (n=105)	Sim	58	55,2
	Não	47	44,8
Resultado LS (n=58)	Positivo	9	15,5
	Negativo	49	84,5

Os grupos, sentinela e não sentinela, não apresentaram diferença estatística entre si pelo teste de Wilcoxon (Tabela 4), a não ser na variável Breslow, o que é explicado nos critérios de inclusão e exclusão.

Nenhuma das variáveis estudadas apresentou distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Realizando-se a análise univariada de todas as características, buscando-se associação com o desfecho positividade do linfonodo sentinela, apenas as variáveis níveis de Clark e Estadiamento mostraram significância abaixo de 5% (Tabela 3)

Tabela 4. Análise Univariada através do Chi-quadrado

<i>Variável</i>	<i>Chi- Quadrado</i>	<i>GL</i>	<i>p</i>
Idade			
Contínuo	31,44	31	0,444
> ou < 40 anos	0,151	1	0,698
> ou < 55 anos	2,99	1	0,083
Sexo	2,24	1	0,135
Col	0,517	1	0,772
Localização	2,88	3	0,409
Breslow			
Contínuo	46,95	40	0,209
Categórico	7,000	3	0,072
Clark	10,45	3	0,015
Histologia	1,131	3	0,770
Ulceração	0,076	1	0,783
TPC			
Contínuo	18,374	19	0,494
> ou < 6 mit./mm ²	0,211	1	0,460
> ou < 9 mit./mm ²	0,488	1	0,370
Estadiamento	41,84	6	0,000 1

Tabela 5. Comparação entre os grupos pelo teste de Wilcoxon

	Idade	Sexo	Cor	Local	Breslow	Clark	Histologia	ulceração	TPC	LDH	
Wilcoxon W	2871,500	2516,000	2386,500	2310,000	1544,000	2228,000	2877,500	2367,500	1443,500	1429,000	
Z	-1,470	-,390	-,643	-1,791	-2,482	-1,754	-,048	-,622	-,598	-1,336	
Asymp. Sig. (2-tailed)	,142	,697	,520	,073	,013	,079	,962	,534	,550	,182	
95% Confidence Interval	Lower Bound	,137	,837	,605	,067	,010	,078	,982	,665	,547	,176
	Upper Bound	,151	,851	,624	,077	,014	,089	,987	,683	,567	,191

4.1 Taxa de proliferação celular

A TPC, quando analisada como variável numérica contínua, não apresentou distribuição normal, com média de 9,6 mitoses /mm², mediana de 6 mitoses/mm² e desvio padrão de 10,36 mitoses/ mm². A amplitude variou entre zero e 43 mitoses. A curva do gráfico demonstrou assimetria positiva com índice de 1,41 e curtose de 1,08, sendo, portanto, platicúrtica (Gráfico 1). Não houve relação significativa entre o TPC e as outras variáveis aferidas candidatas ao quadro da regressão logística.

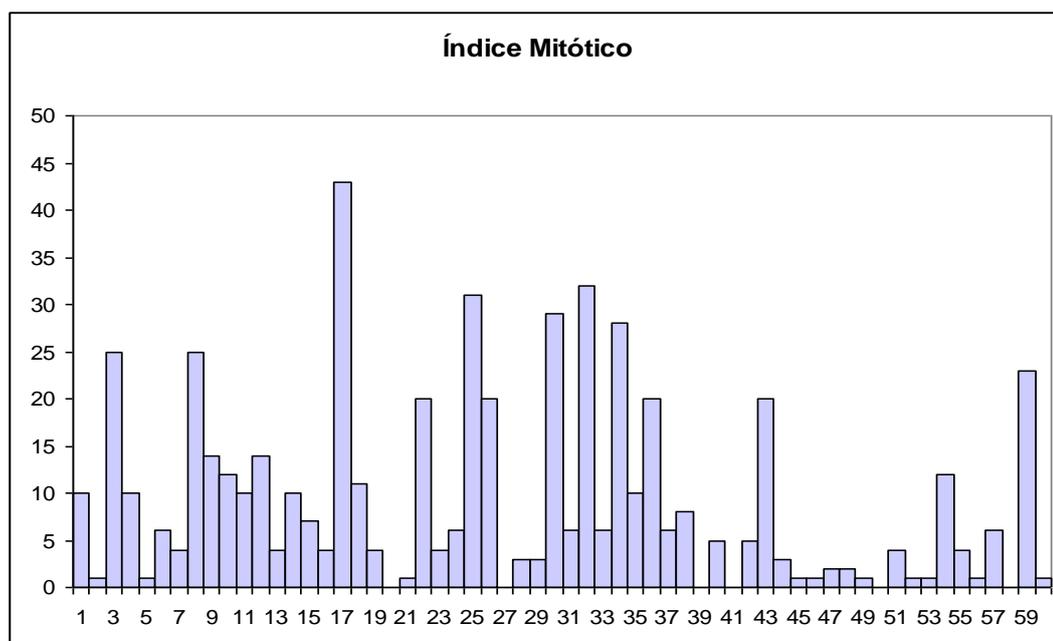


Gráfico 1. Distribuição da variável Taxa de proliferação celular nos pacientes submetidos a PLS

Não houve relação entre o TPC e a positividade do linfonodo sentinela quando realizada análise univariada pelo método do X^2 . Tal fenômeno ocorreu tanto na avaliação como variável contínua, quanto como variável categórica. As classes foram divididas tanto pela média e desvio padrão (9 mitoses), quanto pela mediana (6 mitoses) e apresentaram os mesmos resultados.(Tabela 4).

Ao se realizar a análise multivariada pela técnica de Regressão Logística Binária, nenhuma das variáveis que participaram da regressão apresentaram relação com o desfecho quando utilizado o método enter. Ao se utilizar o método forward stepwise, a única variável que demonstrou relação com a positividade do linfonodo sentinela foi a espessura de breslow, mesmo assim com $p = 0,126$ (Tabela 6).

Tabela 6. Regressão Logística Binária

		B	S.E.	Wald	GL	p
Step 1(a)	Breslow	-,572	,374	2,344	1	0,126
	Constante	5,242	1,895	7,651	1	0,006

Ao se realizar o teste do X^2 relacionando o taxa de proliferação celular (valor contínuo) com linfonodo sentinela, mas separando-se os grupos pela espessura de breslow e pela idade superior ou inferior a 40 anos, percebe-se que não existem valores positivos de LS nos pacientes com espessura da lesão abaixo de 1mm (Tabela 7), o que está em acordo com as diretrizes da literatura, que não preconizam a PLS em pacientes com lesão de espessura fina, ou seja, abaixo de 0,75mm.

Tabela 7. Comparação entre TPC e LS categorizado por Breslow e Idade

Idade	Breslow	TPC	Sentinela		Total	
			Positivo	Negativo		
até 40 anos	Até 1mm		3	*	1	1
			4	*	1	1
			10	*	1	1
		Total			3	3
mais de 40 anos	Até 1mm	TPC	0	*	1	1
			1	*	2	2
			3	*	1	1
			4	*	1	1
			10	*	1	1
			11	*	1	1
			14	*	1	1
			20	*	1	1
Total				9	9	

* Ausência de valores computados para a célula

Nos pacientes com lesão superior a 1mm de espessura, a significância foi superior a 5% , quando tomado o TPC por intervalo contínuo, não importando a categoria abaixo ou acima de 40 anos ($p = 0,136$ e $p = 0,261$ respectivamente)(Tabela 8).

Tabela 8. significância do TPC como variável contínua categorizando-se por Breslow e Idade

Idade	Breslow	Chi-Quadrado	gl	P
até 40 anos	Até 1mm	*	*	*
	1-2 mm	7,0	4	0,136
	2-4mm			
	> 4mm	3,0	2	0,223
mais de 40 anos	Até 1mm	*	*	*
	1-2 mm	4,0	3	0,261
	2-4mm	5,83	9	0,756
	> 4mm	8,000(f)	6	0,238

* Ausência de valores computados para as células

No entanto, ao se categorizar o índice Mitótico em acima ou abaixo de 9 mitoses/ mm² , verifica-se relação inferior a 5 % nos casos com espessura da lesão entre 1-2mm, tanto naqueles pacientes com menos de 40 anos de idade(p= 0,008) ,quanto naqueles com menos de 55 anos de idade(p= 0,047) (Tabela 9).

Tabela 9. Categorização por TPC > 9 < mitoses (Teste X² e Correlação)

Breslow		Valor	GL	P
até 40 anos				
1-2 mm	Chi-Quadrado	7,000(c)	1	0,008
até 55 anos				
1-2 mm	Chi-Quadrado	3,938	1	0,047
	n	9		
	Pearson's R	-0,661		0,052
	Spearman	-0,661		0,052

Ao se categorizar o Taxa de proliferação celular em > 6 mitoses/ mm² e < 6 mitoses/ mm² , o mesmo fenômeno é observado, com uma relação significativa no grupo com espessura de Breslow entre 1-2 mm (Tabela 10)

Tabela 10. Teste de X^2 e Índice de Correlação (Taxa de proliferação celular > 6 < mitoses/ mm²)

	Breslow		Valor	GL	P
até 40 anos					
	1-2 mm	Chi-Square	7,000(c)	1	0,008
		n	7		
		Pearson's R	-1,000	0,0001	
até 55 anos	1-2 mm	Pearson Chi-Square	3,938	1	0,047

Em relação a Regressão Logística, quando utilizado o método *Enter*, não foram incluídas na equação, pelo programa estatístico, nenhuma das variáveis com significância na análise univariada, sendo incluída apenas a constante (Tabela 11).

Tabela 11 . Variáveis Incluídas na equação utilizando-se o método *ENTER*

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 0 Constant	2,639	,732	13,001	1	,000	14,000

Ao se realizar o mesmo processo, no entanto, pelo método *Stepwise Forward Conditional*, as variáveis incluídas foram Breslow, Clark e, no terceiro passo, o Taxa de proliferação celular. Os grupos foram

divididos quanto a haverem realizado a *pesquisa do linfonodo sentinela* e apresentarem idade até 40 anos. A Taxa de proliferação celular foi incluída na equação dividida em menor ou maior do que 9 mitoses/mm², visto que, na análise univariada não houve diferença com a divisão em maior ou menor do que seis mitoses. O TPC não apresentou modificação significativa de predição do desfecho e não pôde ser considerado, portanto, como variável independente para a predição de positividade do linfonodo sentinela (Tabela 12).

Tabela 12. Regressão Logística nos pacientes submetidos a PLS e com idade inferior a 40 anos.

		<i>B</i>	<i>S.E.</i>	<i>Wald</i>	<i>GL</i>	<i>p</i>	Exp(B)
Step 1(a)	Breslow	-0,399	0,141	8,073	1	0,004	0,671
	Constant	3,287	0,785	17,553	1	0,000	26,756
Step 2(b)	Breslow	-0,326	0,181	3,251	1	0,071	0,722
	clark	-2,133	1,076	3,929	1	0,047	0,118
	Constant	11,185	4,397	6,472	1	0,011	72048,776
Step 3(c)	Breslow	-,479	0,271	3,109	1	0,078	0,620
	clark	-4,792	2,897	2,736	1	0,098	0,008
	TPC	,954	0,542	3,101	1	0,078	2,597
	Constant	20,225	11,448	3,121	1	0,077	60756126 4,871

a variáveis incluídas no bloco 1: Breslow

b variáveis incluídas no bloco 2: clark.

c variáveis incluídas no bloco 3: Taxa de proliferação celular

5 DISCUSSÃO

O melanoma maligno cutâneo vem sendo conhecido por muitos cirurgiões ao longo dos anos como uma neoplasia maligna de comportamento, praticamente, imprevisível .

Estudos prévios, têm tentado identificar os principais fatores associados a prognóstico. Desde algum tempo, vem sendo procurada uma correlação entre características da lesão primária e a curva de sobrevida(Clark, From *et al.*, 1969; Breslow, 1970). Na análise de fatores prognósticos realizada pelo *Joint Comittee on Câncer* , publicada em 2001, e envolvendo 17600 pacientes em treze centros mundiais de referência, Balch *et al.*, em um dos poucos estudos prospectivos envolvendo melanoma, concluíram que a espessura da lesão e a presença de ulceração são os principais fatores relacionados a mortalidade. Com associação menos expressiva, também encontravam-se o nível de invasão(Clark IV e V),a idade mais elevada (> 60 anos), a localização da lesão primária (Tronco e Cabeça e Pescoço) e o sexo, com uma discreta piora de prognóstico entre os homens(Balch, Soong *et al.*, 2001).

O próximo fator prognóstico com maior importância, uma vez definido o Breslow e a Ulceração, é a presença ou ausência de comprometimento ganglionar. Este dividido em micro e macro metástase (Balch, Soong *et al.*, 2001; Thompson e Shaw, 2004; Morton, Cochran *et al.*, 2005; Minutilli, Giannarelli *et al.*, 2007).

Até meados da década de 90, a avaliação do estado de comprometimento ou não da cadeia ganglionar ocorria através do esvaziamento ganglionar eletivo. Em 1992, Morton e seus colaboradores publicaram o trabalho que é tido até hoje como marco fundamental na pesquisa minimamente invasiva de comprometimento linfático através da biópsia de *Linfonodo Sentinela*(Morton, Wen *et al.*, 1992). Este último, já

adjetivado por Wagner e Sondak, em um editorial publicado em 2002, como “ mais do que um linfonodo azul” , sendo uma clara entidade biológica composto de células imunocompetentes com capacidade antigênica tumoral.(Wagner e Sondak, 2003; Minutilli, Giannarelli *et al.*, 2007)

Retornando aos trabalhos de Morton, em estudo multicêntrico envolvendo 1135 pacientes, encontrou associação entre a positividade de doença metastática no linfonodo sentinela correspondente e idade abaixo de 60 anos, a espessura da lesão acima de 1,5 milímetros, os níveis de invasão em IV e V ,além da localização em tronco,(Morton, Thompson *et al.*, 1999). Mais tarde, o próprio Morton, em estudo multicêntrico randomizado envolvendo 797 pacientes selecionados para excisão da lesão e observação, enquanto outros 1204 foram selecionados para ampliação e PLS, concluiu que o linfonodo sentinela pode, acuradamente, predizer o status linfonodal do doente, sendo, inclusive custo-efetivo, quando comparado a oitenta por cento de linfadenectomias desnecessárias.(Morton, Cochran *et al.*, 2005; Morton, Howard *et al.*, 2008) Outros estudos, mais adiante, foram capazes de demonstrar um claro ganho se sobrevida em pacientes submetidos a pesquisa de linfonodo sentinela, principalmente no que tange o intervalo livre de doença(Cascinelli, Belli *et al.*, 2000; Crowson, Magro *et al.*, 2006; Morton, Thompson *et al.*, 2006).

O que sempre intrigou a todos os autores foi : quais são os fatores associados a positividade do linfonodo sentinela ?

Esta pergunta, respondida parcialmente pelo MSLT-1, teve vários desdobramentos.

Em 1998, Mraz- Gernhard em relato envolvendo 215 pacientes, propôs a associação entre a espessura da lesão, em especial acima de 3 mm, e o índice mitótico, acima de 5 mitoses/ mm², com a positividade de linfonodo sentinela(Mraz-Gernhard, Sagebiel *et al.*, 1998). Morton et al, em estudo multicentrico conduzido entre 1994 e 1999, analisaram um total de 1135 pacientes selecionados do MSLT-I e do John Wayne Câncer Institute (JWCI). A conclusão foi de que os fatores relacionados a positividade do LS foram idade jovem (abaixo de 60 anos), lesão espessa

(1,5mm – 4 mm), Clark IV e V, além da localização no tronco(Morton, Thompson *et al.*, 1999). Sondak, em estudo envolvendo 429 pacientes, elaborou modelo probabilístico de positividade de linfonodo sentinela, destacando-se as variáveis idade abaixo de 35 anos, Breslow acima de 4mm, presença de ulceração e índice mitótico acima de 5 mitoses/mm² (Sondak, Taylor *et al.*, 2004). Outro que obteve resultados semelhantes foi Wagner com um estudo envolvendo 275 pacientes. Neste trabalho, um percentual de positividade de linfonodo sentinela de 19% foi encontrado. Entre as variáveis avaliadas, foi encontrada associação com a espessura de breslow (em torno de 1,25 mm) e o índice mitótico acima de 6 mitoses/mm². Fato interessante, é que a espessura da lesão apresentou resultados significativos tanto quando avaliada como variável contínua quanto dividida em categorias. No entanto, utilizando-se o método analítico de regressão logística, ao se incluir na equação a espessura da lesão como categoria, não houve significância do índice mitótico. Por outro lado, ao se incluir a espessura da lesão como variável contínua, o IM foi significativo. Outra variável que apresentou desempenho independente foi a presença ou ausência de ulceração(Wagner, Gordon *et al.*, 2000).

Baseados nestes relatos, vários pesquisadores começaram o estudo mais aprofundado de uma variável, inicialmente não tão valorizada, que, devido aos resultados expressivos encontrados em análises multivariadas, cresceu em importância no cenário do melanoma maligno cutâneo. Esta variável é a taxa de proliferação celular.

Karjalainen, em estudo retrospectivo conduzido entre 1974 e 1989 , e envolvendo 369 pacientes, analisou o valor da TPC no prognóstico de pacientes com MMC (Karjalainen, Eskelinen *et al.*, 1998). Em seu trabalho, a TPC foi avaliada através do Índice Mitótico , medido em número de mitoses a cada dez campos de grande aumento. Outro parâmetro estudado foi o *IM por volume corrigido* (IMVC) , ou seja, o número de figuras mitóticas em cada milímetro quadrado de tecido neoplásico. Os resultados encontrados apontaram, entre outras coisas, uma associação entre o IM e o IMVC como preditores de sobrevida ,

quando excluídos itens com maior peso como espessura e ulceração. O IMVC se mostrou um melhor parâmetro de previsão do intervalo livre de doença. Azzola et al, também realizando estudo retrospectivo envolvendo 3661 pacientes, encontraram correlação positiva entre o número de mitoses e a piora do prognóstico. Além disso, esta correlação foi mais exuberante quando o IM foi avaliado enquanto variável categórica do que variável contínua.(Azzola, Shaw *et al.*, 2003).

Outra relação estudada do índice mitótico, já citada na discussão, foi com a positividade do linfonodo sentinela. Kesmodel et al, em estudo prospectivo conduzido na Filadélfia, analisaram 2123 casos, na tentativa de estabelecer fatores preditores de positividade do LS em pacientes com espessura de Breslow inferior a um milímetro (Kesmodel, Karakousis *et al.*, 2005). Este estudo, baseado no fato de que a mortalidade neste grupo de pacientes é da casa de 12%, tentou estabelecer características da lesão primária que tornassem imperativo a pesquisa do linfonodo sentinela neste grupo que, teoricamente, não apresentariam indicação clínica para realização do procedimento. A associação encontrada foi entre o IM acima de 0 mitoses/mm² e a positividade de linfonodo sentinela. Também Kruper, estudando pacientes com melanoma em estágios I e II do AJCC, encontrou relação entre o IM acima de zero e a positividade do LS em pacientes com espessura da lesão abaixo 1mm. Vários outros trabalhos também encontraram associação entre o índice mitótico elevado e a positividade de linfonodo sentinela, especialmente em pacientes jovens e com espessura de breslow entre 1-2 milímetros(Wagner, Gordon *et al.*, 2000; Minutilli, Giannarelli *et al.*, 2007; Paek, Griffith *et al.*, 2007; Pearl, Pacifico *et al.*, 2007). Minutilli et al., propõem, inclusive, um papel terapêutico na biópsia de LS neste grupo de pacientes, visto que, pacientes com menor espessura da lesão apresentam uma menor tendência à metastatização hematogênica, sendo a via linfática a preferencial e, portanto, a remoção de linfonodos comprometidos teria influência na sobrevida.

Em relação ao método de avaliação da taxa de proliferação celular, o mais popularizado é a mensuração do índice mitótico. Alguns

autores publicaram seus trabalhos levando em consideração a contagem de mitoses em dez campos de grande aumento. (Wagner, Gordon *et al.*, 2000) Outros levaram em consideração o número de mitoses em cada milímetro quadrado de tecido neoplásico (Crowson, Magro *et al.*, 2006; Minutilli, Giannarelli *et al.*, 2007; Paek, Griffith *et al.*, 2007; Sassen, Shaw *et al.*, 2008). Outro método de avaliação da TPC, explorada por alguns pesquisadores, foi a utilização do marcador imuno-histoquímico Ki-67. Como já citado em métodos, o Ki-67 é uma proteína capaz de marcar uma reação nuclear antígeno-anticorpo em células que se encontram, principalmente, nas fases G2, S e M do ciclo celular. Estas células adotam a coloração acastanhada de seus núcleos, podendo ser mensuradas, em termos percentuais, em relação à área de tecido não marcado. Neste trabalho, foi realizada a opção por uma combinação de técnicas em que as figuras de mitose marcadas pelo Ki-67 foram contadas em uma área aproximada de um milímetro quadrado.

No presente estudo, de modo semelhante a outras descrições, foi procurada associação entre as variáveis e a positividade do LS. Foi realizada, previamente a regressão logística, a análise univariada, visando seleção das variáveis para o grid. Diferentemente de outros trabalhos, apenas os níveis de Clark apresentaram associação com o desfecho procurado (Tabela 3). Provavelmente isto deve-se a um viés de seleção da amostra, visto tratar-se de um número pequeno de pacientes.

Já na análise multivariada, a exemplo de outros estudos, a espessura de Breslow foi a variável que mostrou o maior nível de associação (Tabelas 5 e 6). Ao ajustar-se a regressão, mantendo-se fixos a idade e os níveis de Breslow, a taxa de proliferação celular passou a apresentar papel de destaque na explicação do desfecho procurado.

O interessante da presente discussão, é que foram obtidos resultados muito semelhantes aos encontrados nos trabalhos de Morton (Morton, Cochran *et al.*, 2005), McMasters (McMasters, Wong *et al.*, 2001), Caracó (Caraco, Marone *et al.*, 2006), Sassen (Sassen, Shaw *et al.*, 2008) e Paek (Paek, Griffith *et al.*, 2007), em que pareceu haver uma associação entre a presença de metástases no linfonodo sentinela e a

idade mais jovem (35 a 50 anos), a espessura de Breslow intermediária (1-2 mm) e uma taxa de proliferação celular acima de 5 ou 6 mitoses/mm².

Na opinião do autor, uma alta espessura de Breslow , maior do que 4mm, dada a possibilidade de invasão maciça tumoral do sistema de drenagem linfática e dos gânglios, contribui para a obtenção de resultados falso-negativos. Isto explicaria, em parte, o por que de pacientes mais jovens apresentarem uma maior incidência de linfonodos positivos. Dado que a média de espessura tumoral em pacientes jovens (abaixo de 35 anos) é menor do que em pacientes mais velhos (acima de 60 anos) e que a replicação celular em jovens é, naturalmente, superior a de pacientes idosos; explicam-se as associações encontradas no presente trabalho.

É bem verdade, que não foi possível estabelecer um relação de dependência entre a TPC e a metastatização linfática.

No entanto, tal associação parece, de fato, existir, o que provavelmente poderá ser comprovado com o aumento do número de pacientes em estudo.

6 CONCLUSÕES:

1) O taxa de proliferação celular não demonstrou comportamento de variável independente em relação ao desfecho positividade de linfonodo sentinela.

2) A única variável que demonstrou característica independente de predição de linfonodo sentinela, conforme visualizado no grid de regressão, foi a espessura de Breslow.

3) Possivelmente, em grupos bem selecionados, como pacientes jovens e com lesões de espessura intermediária (1-2 mm) , o taxa de proliferação celular seja um boa ferramenta na indicação da biópsia do linfonodo sentinela.

4) Pelo presente estudo, não há qualquer variável, entre as estudadas, através do qual se possa prescindir da biópsia ganglionar , dadas as características da lesão primária.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azzola, M. F., H. M. Shaw, *et al.* Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. Cancer, v.97, n.6, Mar 15, p.1488-98. 2003.

Balch, C. M., S. J. Soong, *et al.* Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. J Clin Oncol, v.19, n.16, Aug 15, p.3622-34. 2001.

Brady, M. S. Sentinel lymph node mapping in patients with cutaneous melanoma. Dermatol Surg, v.30, n.2 Pt 2, Feb, p.272-8. 2004.

Breslow, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Ann Surg, v.172, n.5, Nov, p.902-8. 1970.

Cancer, I. N. D. Estatísticas do Câncer 2008 2008.

Caraco, C., U. Marone, *et al.* Age as predictor in patients with cutaneous melanoma submitted to sentinel lymph node biopsy. Eur J Surg Oncol, v.32, n.9, Nov, p.970-3. 2006.

Cascinelli, N., F. Belli, *et al.* Sentinel lymph node biopsy in cutaneous melanoma: the WHO Melanoma Program experience. Ann Surg Oncol, v.7, n.6, Jul, p.469-74. 2000.

Chakera, A. H., L. B. Hansen, *et al.* In-transit sentinel nodes must be found: implication from a 10-year follow-up study in melanoma. Melanoma Res, v.18, n.5, Oct, p.359-64. 2008.

Clark, W. H., Jr., L. From, *et al.* The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. Cancer Res, v.29, n.3, Mar, p.705-27. 1969.

Cook, J. Surgical margins for resection of primary cutaneous melanoma. Clin Dermatol, v.22, n.3, May-Jun, p.228-33. 2004.

Cox, D. Regression Models and Life-Tables. Journal of the Royal Statistical Society, v.34, n.2, p.187-220. 1972.

Crowson, A. N., C. M. Magro, *et al.* Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. Mod Pathol, v.19 Suppl 2, Feb, p.S71-87. 2006.

Doubrovsky, A., J. H. De Wilt, *et al.* Sentinel node biopsy provides more accurate staging than elective lymph node dissection in patients with cutaneous melanoma. Ann Surg Oncol, v.11, n.9, Sep, p.829-36. 2004.

Govindarajan, A., D. M. Ghazarian, *et al.* Histological features of melanoma sentinel lymph node metastases associated with status of the completion lymphadenectomy and rate of subsequent relapse. Ann Surg Oncol, v.14, n.2, Feb, p.906-12. 2007.

Karjalainen, J. M., M. J. Eskelinen, *et al.* Mitotic rate and S-phase fraction as prognostic factors in stage I cutaneous malignant melanoma. Br J Cancer, v.77, n.11, Jun, p.1917-25. 1998.

Kesmodel, S. B., G. C. Karakousis, *et al.* Mitotic rate as a predictor of sentinel lymph node positivity in patients with thin melanomas. Ann Surg Oncol, v.12, n.6, Jun, p.449-58. 2005.

Kruper, L. L., F. R. Spitz, *et al.* Predicting sentinel node status in AJCC stage I/II primary cutaneous melanoma. Cancer, v.107, n.10, Nov 15, p.2436-45. 2006.

Mcmasters, K. M., S. L. Wong, *et al.* Factors that predict the presence of sentinel lymph node metastasis in patients with melanoma. Surgery, v.130, n.2, Aug, p.151-6. 2001.

Melanoma Statistics.

Miller, A. J. e M. C. Mihm, Jr. Melanoma. N Engl J Med, v.355, n.1, Jul 6, p.51-65. 2006.

Minutilli, E., D. Giannarelli, *et al.* Sentinel node biopsy in cutaneous melanoma: correlations between melanoma prognostic factors and sentinel node status. J Exp Clin Cancer Res, v.26, n.1, Mar, p.71-6. 2007.

Morton, D. L., A. J. Cochran, *et al.* Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. Ann Surg, v.242, n.3, Sep, p.302-11; discussion 311-3. 2005.

Morton, D. L., J. F. Thompson, *et al.* Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. N Engl J Med, v.355, n.13, Sep 28, p.1307-17. 2006.

_____. Validation of the accuracy of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early-stage melanoma: a multicenter trial. Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial Group. Ann Surg, v.230, n.4, Oct, p.453-63; discussion 463-5. 1999.

Morton, D. L., D. R. Wen, *et al.* Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. Arch Surg, v.127, n.4, Apr, p.392-9. 1992.

Morton, R. L., K. Howard, *et al.* The Cost-Effectiveness of Sentinel Node Biopsy in Patients with Intermediate Thickness Primary Cutaneous Melanoma. Ann Surg Oncol, Sep 30. 2008.

Mraz-Gernhard, S., R. W. Sagebiel, *et al.* Prediction of sentinel lymph node micrometastasis by histological features in primary cutaneous malignant melanoma. Arch Dermatol, v.134, n.8, Aug, p.983-7. 1998.

Paek, S. C., K. A. Griffith, *et al.* The impact of factors beyond Breslow depth on predicting sentinel lymph node positivity in melanoma. Cancer, v.109, n.1, Jan 1, p.100-8. 2007.

Patel, S. G., D. G. Coit, *et al.* Sentinel lymph node biopsy for cutaneous head and neck melanomas. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, v.128, n.3, Mar, p.285-91. 2002.

Pearl, R. A., M. D. Pacifico, *et al.* Ki-67 expression in melanoma. A potential method of risk assessment for the patient with a positive sentinel node. J Exp Clin Cancer Res, v.26, n.1, Mar, p.109-15. 2007.

Results, S. E. A. E. SEER. 2008.

Retsas, S. Cutaneous melanoma. Lancet, v.365, n.9476, Jun 11-17, p.2003-4; author reply 2004-5. 2005.

Sassen, S., H. M. Shaw, *et al.* The complex relationships between sentinel node positivity, patient age, and primary tumor desmoplasia: analysis of 2303 melanoma patients treated at a single center. Ann Surg Oncol, v.15, n.2, Feb, p.630-7. 2008.

Sondak, V. K., J. M. Taylor, *et al.* Mitotic rate and younger age are predictors of sentinel lymph node positivity: lessons learned from the generation of a probabilistic model. Ann Surg Oncol, v.11, n.3, Mar, p.247-58. 2004.

Taylor, R. C., A. Patel, *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. J Clin Oncol, v.25, n.7, Mar 1, p.869-75. 2007.

Thompson, A., R. F. Uren, *et al.* Lymphoscintigraphy. St. Louis, Missouri: Karen Berger, v.1. 2003a. 19 p.

_____. Lymphoscintigraphy. St. Louis, Missouri: Karen Berger, v.Cutaneous Melanoma. 2003b. 19 p.

Thompson, J. F., R. A. Scolyer, *et al.* Cutaneous melanoma. Lancet, v.365, n.9460, Feb 19-25, p.687-701. 2005.

Thompson, J. F. e H. M. Shaw. Should tumor mitotic rate and patient age, as well as tumor thickness, be used to select melanoma patients for sentinel node biopsy? Ann Surg Oncol, v.11, n.3, Mar, p.233-5. 2004.

Thompson, J. F. e R. F. Uren. Lymphatic mapping in management of patients with primary cutaneous melanoma. Lancet Oncol, v.6, n.11, Nov, p.877-85. 2005.

Van Akkooi, A. C., J. H. De Wilt, *et al.* Clinical relevance of melanoma micrometastases (<0.1 mm) in sentinel nodes: are these nodes to be considered negative? Ann Oncol, v.17, n.10, Oct, p.1578-85. 2006.

Wagner, J. D., M. S. Gordon, *et al.* Predicting sentinel and residual lymph node basin disease after sentinel lymph node biopsy for melanoma. Cancer, v.89, n.2, Jul 15, p.453-62. 2000.

Wagner, J. D. e V. K. Sondak. The sentinel lymph node: more than just another blue lymph node. Cancer, v.97, n.8, Apr 15, p.1821-3. 2003.

Yee, V. S., J. F. Thompson, *et al.* Outcome in 846 cutaneous melanoma patients from a single center after a negative sentinel node biopsy. Ann Surg Oncol, v.12, n.6, Jun, p.429-39. 2005.