



## Índice de proliferação celular em melanoma e em nevo melanocítico

*Maria Leticia Marques Pinheiro, João Lucas Rodrigues Dos Santos, Marcos Vinícius Macedo de Oliveira, Camila Santos Pereira, Ludmilla Regina de Souza, Alfredo Maurício Batista de Paula*

### Introdução

Dentre os cânceres de pele, o melanoma maligno cutâneo (MC) é o de menor incidência, representando cerca de 3 a 5% dos casos. Contudo, é responsável por aproximadamente 75% das mortes dentre esses tipos de cânceres. O tempo de evolução é essencial na determinação do prognóstico e a morbimortalidade do melanoma tem estreita relação com a ocorrência de metástases. Na maioria dos casos, a tumorigênese resulta da interação de fatores como a exposição à luz ultravioleta e fatores genéticos[1, 2].

O nevo melanocítico (NM) é uma lesão neoplásica benigna comum, que acomete preferencialmente indivíduos caucasianos e está fortemente ligada a exposição solar, principalmente quando este efeito é acumulativo. Embora não seja regra, nevo tem potencial para o desenvolvimento do mesmo, especialmente nos displásicos e que apresentam atipias celulares. Estudos têm mostrado que existe uma interferência significativa nas vias de sinalização dos nevos e melanomas[3, 4].

O Ki67 é uma proteína nuclear, não histona, associada à proliferação celular. Uma vez que está presente em todas as fases ativas do ciclo, ela identifica bem a atividade proliferativa. O Ki67 é encontrado em tecidos neoplásicos malignos e sua expressão tem relação direta com a redução da taxa de sobrevivência, aumento da mortalidade e das taxas de recorrência local e metástases em diversas neoplasias[5]. A proliferação celular é fundamental para o crescimento e desenvolvimento do tumor. Portanto, sua determinação pode fornecer dados relevantes sobre a agressividade e prognóstico, bem como no desenvolvimento de terapia voltada para vias de divisão celular[6].

O presente estudo teve por objetivo a análise do índice de proliferação celular em lesões de melanoma cutâneo humano, nevo melanocítico, e tecido epitelial cutâneo normal.

### Materiais e métodos

Foram utilizadas 17 amostras de MC, 20 de NM, e 16 amostras de pele normal obtidas a partir de procedimentos estéticos (controle). Os tecidos foram avaliados histologicamente confirmando-se os diagnósticos. Informações clínicas como sexo, idade, localização anatômica da biópsia, aspectos histopatológicos e imunohistoquímicos foram analisadas. As avaliações histopatológicas foram realizadas sob microscopia de luz, após coloração com hematoxilina e eosina e classificadas de acordo com o proposto por Clark[7].

As reações de imunohistoquímica foram realizadas através da técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. As amostras foram submetidas à recuperação antigênica e incubadas com leite desnatado em pó. Em seguida, houve incubação com anticorpo anti- Ki67 (clone MIB-1, Dako) por 18 horas. A reação foi revelada pelo emprego do aminoetilcarbazol e contracorado com hematoxilina de Mayer.

Foram realizadas fotomicrografias no aumento de 400X, e a contagem de células ocorreu em nos 10 locais, onde a expressão de Ki67 foi mais acentuada. O índice de proliferação celular (IPC) foi determinado pela proporção de células neoplásicas ou epiteliais marcadas em relação ao total desses tipos celulares presentes no campo da imagem.

Os dados foram digitalizados no *software* de estatística SPSS<sup>®</sup> 22.0. As médias dos índices de proliferação celular dos grupos investigados foram avaliadas pela análise de variância (Anova) e correção de Bonferroni. Foram considerados significativos resultados com  $p < 0.005$ .

### Resultados

Os casos de melanoma foram representados por oito homens e nove mulheres, abrangendo uma faixa etária entre 32 e 72 anos, com mediana de idade 55 anos. As lesões do MC estavam distribuídas na região de

---

Apoio financeiro: FAPEMIG e CNPq

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa das Faculdades Integradas Pitágoras de Montes Claros: n° 714.865/2014

cabeça e pescoço (35.3%), tronco e dorso (23.5%), e membros (41.2%). A maioria dos casos se encontravam nos níveis IV-V de Clark (64.7%).

A imunomarcagem positiva para Ki67 foi definida como coloração nuclear positiva das células tumorais e/ou epiteliais



(figura 1). As células proliferativas neoplásicas foram localizadas principalmente nas bordas das ilhotas infiltrativas dos nevos e melanomas. No tecido cutâneo normal, foi observada fraca marcação, identificada principalmente na lâmina basal.

A figura 2 mostra a diferença significativa do índice de proliferação celular entre os grupos de lesões estudados ( $p < 0.001$ ). A média do IPC do MC foi de  $33.2 \pm 6.9\%$  (17.5-48.1%); de  $1.2 \pm 0.8\%$  (0.1-2.6%) no NM; e  $1.0 \pm 1.9\%$  (0-6.2%) no grupo controle.

## Discussão

O MC demonstrou maior índice de proliferação celular, em relação ao NM. O processo de desenvolvimento do câncer ocorre em decorrência de proliferação celular desregulada, a partir de propriedades adquiridas pelas células tumorais como multiplicação não regulada e perda do controle da apoptose [1, 4]. O NM, por se tratar de lesão neoplásica benigna, bem como a pele normal, não apresentaram altas expressões de Ki67. Elevada atividade proliferativa das células tumorais correlaciona-se com maior agressividade da lesão [8].

Anormalidades ocorridas durante o ciclo celular podem ter como consequência o desenvolvimento de tumores malignos. Para regulação deste ciclo existem mecanismos de reparação de lesões genéticas e do controle da divisão celular. O *TP53*, chamado "guardião do genoma", é um gene supressor de tumor, cuja função está deficiente no melanoma por inativação de sua função. No melanoma, o microRNA 18b (miR-18b) estando desregulado contribui de forma indireta para a inativação do p53. O oncogene MDM2 também está envolvido no processo, ao agir diretamente sobre o p53 impedindo que este desempenhe suas funções. Assim o papel do miR-18b é suprimir o MDM2 e ativar o p53, ação que fica comprometida quando o miR-18b está desregulado [9, 10].

O microRNA-21 (miR-21) é outra molécula que compromete a expressão de mRNA de proteínas supressoras de tumor, promovendo sua inibição. Ele também inibe a expressão de mRNA de proteínas como a PTEN (homólogo de tensina e fosfatase) e a PDCD4 (proteína de morte celular programada-4), supressoras tumorais. miR-21 impede que a PDCD4 promova a apoptose celular através da modulação da PTEN via PI3K (Fosfoinosítídeo 3-quinase). Ademais, o miR-21 interfere negativamente na via do p53 e induz a expressão da ciclina D1 no ciclo celular. Portanto, a disfunção de genes supressores de tumor torna o ciclo celular suscetível a processos aberrantes e proliferação descontrolada, fundamentais ao desenvolvimento e progressão tumoral no melanoma cutâneo [9].

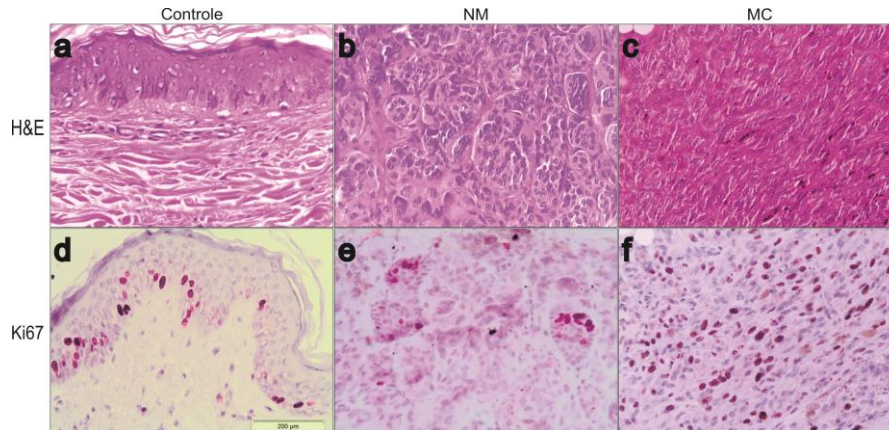
## Conclusão

Ante ao estudo realizado, observa-se diferença significativa do índice de proliferação celular, detectado pelo anticorpo anti-Ki67 na imunohistoquímica, quando se comparam lesões de MC com NC e tecido epitelial normal. Verificou-se maior índice de proliferação nos melanomas. Índices baixos e semelhantes estatisticamente foram observados nos nevos e tecidos normais de pele. Sugere-se, portanto, que o IPC mensurado pelo Ki67 possa contribuir para o diagnóstico diferencial entre as lesões neoplásicas melanocíticas malignas e benignas.

## Referências

1. Cirenajwis, H., et al., *Molecular stratification of metastatic melanoma using gene expression profiling: prediction of survival outcome and benefit from molecular targeted therapy*. Oncotarget, 2015.
2. Shenberger, D.W., *Cutaneous malignant melanoma: a primary care perspective*. Am Fam Physician, 2012. **85**(2): p. 161-8.
3. Ellis, L.Z., et al., *A case of multiple atypical nevi with co-localized Basal cell carcinomas on the scalp: insight into the pathogenesis*. J Drugs Dermatol, 2015. **14**(5): p. 502-5.
4. Taloni, A., et al., *Mechanical properties of growing melanocytic nevi and the progression to melanoma*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94229.
5. Vascellari, M., et al., *Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis*. Vet Pathol, 2013. **50**(1): p. 110-21.
6. Hale, C.S., et al., *Mitotic rate in melanoma: prognostic value of immunostaining and computer-assisted image analysis*. Am J Surg Pathol, 2013. **37**(6): p. 882-9.
7. Clark, W.H., Jr., et al., *The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin*. Cancer Res, 1969. **29**(3): p. 705-27.
8. Ladstein, R.G., et al., *Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 140.
9. Bennett, P.E., et al., *miR in melanoma development: miRNAs and acquired hallmarks of cancer in melanoma*. Physiol Genomics, 2013. **45**(22): p. 1049-59.
10. Dar, A.A., et al., *The role of miR-18b in MDM2-p53 pathway signaling and melanoma progression*. J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(6): p. 433-42.

**Figura 1** - Grupos de amostras estudadas em diferentes colorações histopatológicas (barra de escala: 200µm) A-C: Cortes histológicos com coloração em Hematoxilina e Eosina (H&E). D-F: Identificação do antígeno Ki67 por imunohistoquímica (coloração com AEC e contracoloração com Hematoxilina de Mayers).



**Figura 2** - Médias do índice de proliferação celular dos grupos de amostras investigados. Teste estatístico: análise de variância com correções de Bonferroni. Valores estatisticamente significativos:  $p < 0.005$ .

