



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS PASSO FUNDO**

CURSO DE MEDICINA

ANA JULIA DELAZERI

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS
CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO
SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA**

PASSO FUNDO

2018

ANA JULIA DELAZERI

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS
CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO
SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIDA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao curso de Medicina da Universidade
Federal da Fronteira Sul, como requisito para
obtenção do título de Bacharel em Medicina.

Orientador: Prof. Me. Josiane Borges Stolfo

PASSO FUNDO

2018

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Delazeri, Ana Julia

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM
MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS:: ESTUDO DE ACOMETIMENTO
DO LINFONODO SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA / Ana
Julia Delazeri. -- 2018.

5 f.

Orientadora: Mestre Josiane Borges Stolfo.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Medicina, Passo Fundo, RS , 2018.

1. Melanoma. 2. Imunoterapia. 3. Linfonodo Sentinela.
4. PD-L1 e MECA-79. 5. Prognóstico. I. Stolfo, Josiane
Borges, orient. II. Universidade Federal da Fronteira
Sul. III. Título.

ANA JULIA DELAZERI

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS
CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO
SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Prof. Josiane Borges Stolfo

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Me. Josiane Borges Stolfo – UFFS

Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti – UFFS

Prof. Me. Daniela Augustin Silveira

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus. Pela minha vida, pelo amparo em todos os momentos, e pelas vitórias concedidas a cada dia. *“Porque Dele, e por Ele, e para Ele são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém!”* (Romanos 11:36, Bíblia).

Agradeço à minha mãe, Jossenir, e ao meu pai, EneDir, pelo imenso esforço e sacrifício para que eu pudesse realizar o sonho de cursar Medicina. Abdicaram de muitos planos, e até mesmo anularam as próprias vontades para me proporcionar a oportunidade de estudar, com conforto e qualidade de vida. Vocês são meu exemplo, e tenho muito orgulho de vocês! Serei imensa e eternamente grata, e espero um dia poder retribuir, ao menos um pouquinho, todo esse amor e generosidade. Amo muito vocês!

À minha irmã, Maria Luiza, por estar comigo desde o início dessa jornada, passando pelas dificuldades e pelas alegrias. Só nós sabemos o quão gratificante é ver a vitória e o sucesso uma da outra! Nós conseguimos, mana!

Ao meu irmão, José Luís, que, mesmo um pouco distante, sempre me inspirou força e garra para alcançar meus objetivos. A caçula cresceu, Zé!

Aos meus avós, Pedro, Lydia e Zenaide, pelo carinho, apoio e orações. Vocês são colo de infinita sabedoria e ternura. Amo vocês!

Ao meu tio, Jaci, por ter acreditado no meu sonho e potencial, criando a ponte para que eu chegasse até aqui. Serei eternamente grata. Obrigada, tio, do fundo do coração!

À minha orientadora, professora Josiane, pelo empenho, paciência e comprometimento indescritível. A elaboração e execução deste projeto me proporcionaram um enorme aprendizado, tanto de ciência quanto de postura ética e profissional. Mais que uma excelente médica e professora, és um exemplo de pessoa! Obrigada, prof.^a, por todos os ensinamentos! *“O bom professor explica. O professor superior demonstra. O grande professor inspira!”* (William Arthur Ward).

À toda minha família e amigos, que estiverem sempre ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso. O incentivo de todos vocês sempre foi minha energia para encarar este desafio. E ao País, por me oportunizar uma graduação pública e gratuita.

“Se hoje eu consigo enxergar mais longe, é porque me apoiei no ombro de gigantes”
(Isaac Newton)

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus por me dar a primeira oportunidade de todas: a vida. Por ser Ele a rocha sobre a qual construo minha história, guiando meus passos no Seu divino querer. Por ter, de sobremaneira, me abençoado com seu excelso amor. Oferto toda minha gratidão ao Deus criador dos céus e da terra, que é maravilhoso e mui digno de louvor.

Aos meus pais, Enedir e Jossenir pelo incondicional apoio e sustento. A minha irmã, Maria Luiza, por ser mais que uma irmã em todos os momentos. Ao meu irmão, José Luís, pelo incentivo, e exemplo de que todos os sonhos podem, sim, ser realizados.

“Pois será como a árvore plantada junto a ribeiros de águas, a qual dá o seu fruto no seu tempo; as suas folhas não cairão, e tudo quanto fizer prosperará” (BÍBLIA, Salmos, 1, 3).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	PROJETO DE PESQUISA	14
2.1	DESENVOLVIMENTO	14
2.1.1	RESUMO INFORMATIVO	14
2.1.2	TEMA	15
2.1.3	PROBLEMA	16
2.1.4	HIPÓTESE	16
2.1.5	OBJETIVOS	16
2.1.6	JUSTIFICATIVA	16
2.1.7	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1.7.1	OS MELANÓCITOS	16
2.1.7.2	MELANOMA	17
2.1.7.3	A VIA DO PD E TUMORES	21
2.1.7.4	AS VÊNULAS DE ENDOTÉLIO ALTO E MECA-79	22
2.1.7.5	ACOMETIMENTO DO LINFONODO SENTINELA	24
2.1.8	METODOLOGIA	24
2.1.8.1	TIPO DE ESTUDO	24
2.1.8.2	LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO	24
2.1.8.3	POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM	24
2.1.8.3.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	25
2.1.8.3.2	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	25
2.1.8.4	VÁRIAVEIS E INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS	25
2.1.8.5	ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	26
2.1.8.6	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	26
2.1.8.7	ANÁLISE DE DADOS	27
2.1.8.8	ASPECTOS ÉTICOS	27
2.1.9	RECURSOS	28
2.1.10	CRONOGRAMA	29

2.1.11	REFERÊNCIAS	31
2.1.12	APÊNDICES	35
2.1.2.12.1	APÊNDICE A	35
2.1.2.12.2	APÊNDICE B	36
2.1.2.12.3	APÊNDICE C	39
2.1.2.12.4	APÊNDICE D	40
2.1.2.12.5	APÊNDICE E	41
2.2	RELATÓRIO DE PESQUISA	45
2.2.1	APRESENTAÇÃO	45
2.2.2	DESENVOLVIMENTO	45
2.2.2.3	PERÍODO DA COLETA DE DADOS	45
2.2.2.4	PERDAS E RECUSAS	46
2.2.2.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
3	ARTIGO CIENTÍFICO	47
3.1	RESUMO	47
3.2	INTRODUÇÃO	49
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.4	RESULTADOS	52
3.5	DISCUSSÃO	55
3.6	AGRADECIMENTOS	58
3.7	REFERÊNCIAS	58
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
5	ANEXOS	63
5.1	NORMAS DA REVISTA PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO	64
5.2	COMPROVANTE DE SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	82
5.3	PARECER DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	83
5.4	TERMO DE CIÊNCIA DO VOLUME FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO	86

RESUMO

Este volume apresenta o Trabalho de Conclusão de Curso, requerido pela Universidade Federal da Fronteira Sul para graduação em Medicina, cujo tema é *Avaliação da Expressão de PD-L1 e MECA-79 em Melanomas Cutâneos Primários: Estudo de Acometimento do Linfonodo Sentinela e Análise de Sobrevida*, que versa sobre as correlações entre marcadores imuno-histoquímicos e acometimento de linfonodo sentinela, entre si, bem como com a predição prognóstica. O estudo está em conformidade com o Manual de Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal da Fronteira Sul, 2º edição, revisado e atualizado no ano de 2015. Este volume é composto por um Projeto de Pesquisa, onde foi detalhada a relevância do assunto, a problemática e a metodologia para realização da pesquisa. O projeto foi escrito pela acadêmica Ana Julia Delazeri sob a orientação da prof^a. Josiane Borges Stolfo, a fim de atender as demandas dos componentes curriculares: Pesquisa em Saúde, cursado no segundo semestre de 2017; e Trabalho de Conclusão de Curso I e II, cursados nos respectivos semestres de 2018; ofertados pela Universidade Federal da Fronteira Sul. O Projeto de Pesquisa é seguido por um Relatório de Pesquisa, que detalha como se deram as atividades realizadas, os obstáculos enfrentados e as resoluções de problemas. Por fim, conta ainda com um Artigo, embasado nos dados obtidos durante o desenvolvimento da pesquisa, que passaram por cuidadosa análise estatística conforme o proposto na seção de metodologia do referido Projeto de Pesquisa.

Palavras-chave: Melanoma. Linfonodo Sentinela. Biomarcadores. Câncer. Prognóstico.

ABSTRACT

This volume presents the final paper of the Medicine course, from Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo, whose theme is Evaluation of PD-L1 and MECA-79 Expression in Primary Cutaneous Melanomas: Sentinel Lymph Node Impairment and Analysis of Survival, which deals with the correlations between immunohistochemical markers and sentinel lymph node involvement, as well as with prognostic prediction. The study is in accordance with the Manual of Academic Works of the Federal University of Southern Frontier, 2nd edition, revised and updated in the year 2015. This volume is composed of a Research Project, which detailed the relevance of the subject, the problematic and the methodology for carrying out the research. The project was written by the academic Ana Julia Delazeri under the guidance of the teacher. Josiane Borges Stolfo, in order to meet the demands of the curricular components: Health Research, carried out in the second half of 2017; and Course Completion Work I and II, completed in the respective semesters of 2018; offered by the Federal University of the Southern Border. The Research Project is followed by a Research Report, which details how the activities carried out, the obstacles faced and the resolutions of problems were given. Finally, it also has an article, based on the data obtained during the development of the research, which underwent a careful statistical analysis as proposed in the methodology section of the Research Project.

Keywords: Melanoma. Sentinel lymph node. Biomarkers. Cancer. Prognosis.

1 INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é uma neoplasia extremamente agressiva e a mais fatal dentre os cânceres de pele. Têm sua gênese na mutação dos melanócitos da junção dermoepidérmica, oriundas embriologicamente da crista neural. Os melanócitos são responsáveis pela produção de melanina, proteína responsável pela determinação da cor da pele (BRASIL, 2014; VICENTE 2016).

A pele é o principal sítio primário de acometimento do melanoma, sendo necessários vários fatores e eventos para o desenvolvimento desta neoplasia. Uma das alterações mais importantes implica nas mutações do DNA – mutações genéticas, que podem ter origem na ativação de proto-oncogenes ou deleção dos genes responsáveis pela supressão tumoral (BRASIL, 2014).

No Brasil, o câncer (CA) de pele é o mais frequente dos tumores malignos, representando cerca de 30% dos casos – sendo apenas 3% do tipo melanoma. Dentre os vários tipos de CA de pele, o melanoma é o mais agressivo devido a sua origem neuroectodérmica, fato este que potencializa a capacidade de gerar metástases via linfática e/ou hematogênica (BRASIL, 2014; BRASIL 2017).

A exposição à radiação solar de forma crônica e intermitente, ou aguda e intensa, são os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do melanoma. Consoante alguns estudos, a radiação ultravioleta interfere na estabilidade genômica produzida pelo p53, bem como o p21, p16 e proteína retinoblastoma (BERMUDEZ, 2014; VICENTE, 2016).

Os principais grupos acometidos são os que expressam os fototipos I e II de Fitzpatrick. (BRASIL, 2014; BERWICK et al, 2016). Outros fatores de risco incluem lesões pigmentadas (como efélides), um grande número de nevos típicos (mais de 50) ou nevos atípicos, história familiar positiva para nevos displásicos múltiplos ou melanoma (BRASIL, 2014).

O reconhecimento da lesão cutânea causada pelo melanoma se dá por cinco grandes alterações características, agrupadas no mnemônico do ABCDE. A letra A se refere à assimetria da lesão; a letra B se refere às bordas irregulares; a letra C às cores múltiplas; a letra D ao diâmetro; e a letra E à evolução da lesão (TSAO et al., 2015).

A ampla disseminação à população em geral sobre as características de uma lesão possível melanoma é de importância ímpar, pois quando descoberto em

estágios iniciais apresenta bom prognóstico e maior possibilidade de cura. Além disso, cuidados preventivos também são essenciais, evitando-se a exposição solar e lançando mão de barreiras mecânicas – como chapéus, camisetas e guarda-sóis e o uso de protetores solares – são medidas altamente efetivas (BRASIL, 2014; BERWICK et al, 2016).

O diagnóstico definitivo do melanoma é realizado pelos exames clínico e anatomopatológico da lesão. Os principais tipos histológicos com implicância prognóstica são: o melanoma extensivo superficial (MES), melanoma nodular (MN), melanoma lentigo maligno (LMN) e melanoma acral lentiginoso (MAL).

O prognóstico do melanoma é inferido, em especial, pelos achados histopatológicos, sendo a espessura de Breslow em milímetros (mm), e o nível anatômico de Clark, os mais importantes. Estudos mais recentes incluem outros fatores histopatológicos prognósticos, como a presença de ulceração epidérmica, sinais de regressão, número de mitoses, invasões linfática e vascular e presença de linfócitos infiltrantes tumorais (LITs). Na análise da extensão anatômica da lesão usa-se o sistema TMN – onde T indica a extensão do tumor primário; N se refere à existência ou não, e à extensão de metástases em linfonodos regionais; e M à ausência ou presença de metástases à distância (BALCH et al, 2009).

A imunidade tem papel fundamental no processo de defesa do hospedeiro frente uma lesão tumoral. Existem diversas vias inibitórias que são pontos de controle imprescindíveis, e atuam, por exemplo, impedindo que as células T autorreativas passem do processo de seleção negativa e desencadeiem respostas auto-imunes nos tecidos periféricos pelo reconhecimento de auto-antígenos (MULLARD, 2013).

Uma representante dessas vias inibitórias é a via PD (programm death cell), sendo composta pelo PD-1 (programm death cell 1), e seus ligantes PD-L1 e PD-L2 (programm cell death ligand-1 e 2). O PD-L1, um dos focos deste estudo, é um marcador expresso em células tumorais e outras células do sistema imunológico – bem como em células das ilhotas pancreáticas e células vasculares endoteliais (KIM e EDER, 2014).

Apesar da interação PD-1/PD-L1 prevenir uma resposta imune exacerbada, atuando na tolerância periférica aos auto-antígenos (MORENO e RIBAS, 2015), trata-se também de um importante meio de escape das células tumorais ao sistema imune, por inativação dos LITs (FLEMMING, 2012), o que pode ter implicância prognóstica.

Vasos especializados, chamados de Vênulas de Endotélio Alto (VEA), estão presentes em unidades linfoides e facilitam o transporte de linfócitos. As VEA têm papel importante em vários tumores sólidos, como tumores de mama, pulmão e rim. No melanoma, a presença de VEA pode facilitar o influxo de linfócitos infiltrantes tumorais (LITs) – fato este que indicaria uma resposta imune à neoplasia.

O anticorpo monoclonal MECA-79 possibilitou o estudo de determinadas VEAs que apresentam atividade seletiva, marcando vênulas pós-capilares apenas se inflamadas (UCHIMURA & ROSEN, 2006). A existência e densidade das VEA podem ser aferidas pela expressão de MECA-79, bem como a resposta imunológica anti-tumoral. Pode ocorrer a inativação dos LITs no âmbito tumoral quando o PD-L1 se liga ao seu receptor PD-1, oportunizando uma maneira de evasão tumoral (MARTINET et al., 2012, SAKAI et. al., 2014).

A aferição da expressão de marcadores imuno-histoquímicos tem se mostrado um instrumento valioso na avaliação do prognóstico de pacientes portadores de diversos tumores, dentre eles o melanoma (VICENTE, 2016). Uma correta identificação e estratificação da doença pode influenciar na escolha da terapêutica adotada e apresentar benefícios na sobrevida global dos pacientes.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 PROJETO DE PESQUISA

2.1.1 RESUMO INFORMATIVO

O presente estudo visa avaliar o padrão de expressão do PD-L1, a densidade de vasos de endotélio alto (por meio de MECA-79) e o status do linfonodo sentinela em pacientes com melanoma cutâneo primário e correlacionar a expressão do PD-L1 e densidade de vasos de endotélio alto, bem como o status do linfonodo sentinela com a sobrevida dos pacientes com melanoma cutâneo primário, objetivando usá-los como indicadores prognósticos. Para tanto, será realizado um estudo transversal, descritivo, analítico de melanomas cutâneos primários diagnosticados em um laboratório de Patologia da região Norte do Rio Grande do Sul, em um período de cinco anos, para avaliar a expressão de PD-L1, densidade de VEAs através da expressão do MECA-79, e status do linfonodo sentinela pelo método imuno-histoquímico. Os dados serão coletados do sistema de pesquisa de laudos anatomopatológicos do laboratório no período citado. Dos casos selecionados, serão revisados dados referentes ao histórico

clínico, como: sexo, idade, cor, localização do (s) tumor (s), dados macroscópicos da lesão e variáveis histopatológicas dos melanomas de acordo com os protocolos da World Health Organization (WHO) e College Americano of Pathologist. A densidade de VEAs será avaliada pela expressão do MECA-79. Em casos positivos a densidade de VEAs marcadas será graduada em alta, moderada e baixa. A avaliação de PD-L1 será obtida pela verificação da marcação de membrana nos melanócitos neoplásicos. O status do linfonodo sentinela será avaliado quanto a presença ou ausência de metástases, através do estudo histopatológico em lâminadas coradas em HE, ou através do estudo imuno-histoquímico com os anticorpos MELAN-A e HMB-45. Serão critérios de inclusão do estudo: ressecções completas dos melanomas cutâneos primários dos tipos: melanoma extensivo superficial (MES), melanoma nodular (MN), lentigo maligno melanoma (LMM) e melanoma acral lentiginoso (MAL) e que tenham pesquisa de linfonodo sentinela. Serão excluídos casos enviados como biópsia incisional, sem pesquisa de linfonodo sentinela, melanomas “in situ”, lentigo maligno e lesões metastáticas, demais tipos de melanoma que não preencham critérios para os quatro subtipos histológicos mais frequentes – MES, MN, LMM e MAL –, além dos casos que se verifique 50% ou menos de células neoplásicas viáveis, ou pouco material embocado em parafina que inviabilize a realização do estudo imuno-histoquímico. Será utilizada estatística descritiva para verificar a frequência absoluta total e a frequência relativa percentual dos melanomas cutâneos. Para verificar a associação entre as variáveis serão utilizados testes não paramétricos, como Kruskal-Wallis e Mann-Whitney e o teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5%. Crê-se encontrar correlação direta da expressão de PD-L1 e a densidade de vasos de endotélio alto, e o status do linfonodo sentinela com a expectativa de sobrevida dos pacientes com melanoma cutâneo primário

2.1.2 TEMA

A expressão de PD-L1 e a densidade de vasos de endotélio alto aferida pelo MECA-79, e o status do linfonodo sentinela em pacientes com melanoma cutâneo primário e suas implicações prognósticas.

2.1.3 PROBLEMA

Qual a implicação prognóstica da expressão de PD-L1 e a densidade de vasos de endotélio alto, e do acometimento do linfonodo sentinela em melanomas cutâneos primários?

2.1.4 HIPÓTESES

Será encontrada correlação direta da expressão de PD-L1 e a densidade de vasos de endotélio alto, e o status do linfonodo sentinela com a expectativa de sobrevida dos pacientes com melanoma cutâneo primário.

2.1.5 OBJETIVOS

2.1.5.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o padrão de expressão do PD-L1, a densidade de vasos de endotélio alto e o status do linfonodo sentinela em pacientes com melanoma cutâneo primário.

2.1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Correlacionar a expressão do PD-L1 e densidade de vasos de endotélio alto, e o status do linfonodo sentinela com a sobrevida dos pacientes com melanoma cutâneo primário, objetivando usá-los como indicadores prognósticos.

2.1.6 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o número crescente de casos e as altas taxas de mortalidade do melanoma cutâneo primário, é de sobremaneira relevante o estudo de mecanismos que oportunizem inferir o prognóstico dos pacientes acometidos a fim de se estabelecer uma terapêutica adequada.

O presente estudo possibilitará verificar correlação da expressão do PD-L1, da densidade de vasos endotélio alto, e do status do linfonodo sentinela com a sobrevida dos pacientes com melanoma cutâneo primário, podendo usá-los como marcadores prognósticos.

2.1.7 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.7.1 OS MELANÓCITOS

Os melanócitos são células oriundas embriologicamente da crista neural, sendo, portanto, células neuroectodérmicas cujo sítio primário e principal de atividade

é a pele. Alojaram-se em maior concentração na junção dermo-epidérmica, permeando alguns queratinócitos da camada basal. Produzem melanina, a qual se manifesta sob a influência de fatores genéticos e ambientais, bem como sob regulação endócrina (GARTNER e HIATT, 2014; VICENTE, 2016).

A melanina é a proteína que confere à pele sua pigmentação característica. Sua síntese se dá nos melanócitos através de reações envolvendo a enzima tirosinase. A tirosinase e a melanina coabitam em vesículas formadas pelo complexo de Golgi chamadas de melanossomas. No interior dos melanossomas ocorre uma reação de transformação, onde a tirosina (precursora da melanina) converte-se, primeiramente, em 3,4-di-hidroxifenilalanina, desta em dopa-quinona e, por fim, em melanina (GARTNER e HIATT, 2014; VICENTE, 2016).

Assim que o melanossoma atinge sua saturação de melanina, passa a se chamar grânulo de melanina. Esses grânulos de melanina translocam-se ao longo dos melanócitos até injetarem-se no citoplasma dos queratinócitos da camada basal e espinhosa. Alocam-se em posição supranuclear nos queratinócitos, oferecendo – por tal localização – um fator maior de proteção ao DNA contra os possíveis danos da radiação solar e ultravioleta. Ao final do processo, os lisossomas degradam os melanossomas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013; GARTNER e HIATT, 2014; VICENTE, 2016).

A exposição à radiação solar desencadeia e acelera a transferência de melanina para os queratinócitos. Primeiramente, por esse estímulo, ocorre o escurecimento da melanina já existente. Em seguida, em razão da demanda, há aumento da sua síntese (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013; VICENTE, 2016).

2.1.7.2 MELANOMA

O melanoma é o tipo mais agressivo de tumor dentre as neoplasias malignas da pele, em virtude da alta capacidade de gerar doença metastática – capacidade esta oriunda de sua origem neuroectodérmica. A gênese do melanoma está intimamente ligada a exposição ao Sol de forma crônica e intermitente, ou aguda e intensa, cuja radiação ultra-violeta é extremamente mutagênica aos melanócitos pela desestabilização genômica das proteínas retinoblastoma, p53, p21, e p16 (BERMUDEZ, 2014; VICENTE 2016).

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), dentre os vários tipos de câncer (CA) o que predomina, em frequência, no Brasil é o de pele. Abrangendo aproximadamente 30% dos casos de neoplasias malignas no país, o CA de pele é dividido em duas categorias: não-melanoma, que engloba os subtipos carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular; e o melanoma (MATHEUS e VERRI, 2015; BRASIL, 2017). Destes 30%, apenas 3% dos casos são do tipo melanoma – embora seja este o mais preocupante, visto sua peculiaridade inexorável de gerar metástases via hematogênica e/ou linfática. Em 2013, o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) registrou 1.547 casos de morte por melanoma, sendo 903 homens e 644 mulheres. Dados brasileiros, do INCA, apontam a incidência de 5.670 casos no ano de 2016, sendo 3.000 homens e 2.670 mulheres (BRASIL, 2017).

Um estudo publicado em 2011 por Dimitri e colaboradores avaliou dados coletados entre 2003 e 2007, no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, acerca de pacientes com melanoma cutâneo. Foram considerados fatores como idade, cor, sexo, aspecto clínico da lesão, tipo histológico, índice de Breslow, manejo após diagnóstico, tempo de resolução clínica pós-operatório e evolução. Os resultados encontrados permitiram concluir que pacientes do sexo feminino de cor branca são o grupo mais acometido, sendo o melanoma expansivo superficial o de maior prevalência nesse serviço (DIMITRI, 2011). Tal estudo colaborou reinterando dados do ano de 2008 do INCA, onde as maiores taxas estimadas de melanoma se encontravam em homens e mulheres da região Sul do Brasil (BRASIL, 2008).

Em 1969, Clark estabeleceu critérios para classificar os tipos de melanoma. Estes critérios se baseiam em padrões microscópicos de crescimento, e estão atrelados às características clínicas – localização anatômica do tumor primário e idade do paciente. Tais parâmetros propõem quatro subtipos de melanoma (CLARK, 1969).

O Melanoma Extensivo Superficial (MES) é o mais frequente, abrangendo cerca de 2/3 da totalidade de melanomas. Apresenta uma fase de crescimento radial, onde grandes melanócitos se distribuem entre os queratinócitos. Pode ocorrer em todo o corpo, porém observa-se mais regularmente no tronco em homens e nos membros inferiores em mulheres. Os sinais clínicos recaem sobre a variação de cor, assimetria, irregularidade das bordas e diâmetro maior que 6.0mm (BELFORT, 2010).

O Melanoma Nodular (MN) é o segundo subtipo em frequência. Possui padrão de crescimento expansivo, e o componente dérmico contém um nódulo coeso ou pequenos agrupamentos de células tumorais. Os nucléolos são proeminentes e os índices de mitose são altos (BELFORT, 2010).

O Lentigo Maligno (Melanoma) (MLM) acomete, preferencialmente, regiões expostas cronicamente ao Sol, como a face. É mais prevalente na população idosa e está associada à atrofia da epiderme e elastose solar, caracterizadas por proliferação melanocítica linear e aninhada ao longo da junção dermoepidérmica. Apresenta uma extensa mácula irregular, mal delimitada, heterogeneamente pigmentada em graduações de cinza, marrom ou preto (BELFORT, 2010).

O Melanoma Lentiginoso Acral (MAL) costuma acometer a pele das palmas das mãos, das plantas dos pés e regiões subungueais. É o subtipo de melanoma de maior prevalência na população negra, chegando a 80% dos casos. Caracteriza-se por acantose, alongamento das cristas epiteliais e proliferação de melanócitos atípicos – grandes núcleos e nucléolos, e citoplasma preenchido por grânulos de melanina (BELFORT, 2010).

Um estudo recente realizado Shain e colaboradores (2015) propôs um modelo de evolução do melanoma onde a radiação ultravioleta desempenha uma função imprescindível desde o aparecimento da lesão benigna até adquirir caráter invasivo. Além disso, sugeriu que a maioria das lesões possui determinadas mutações condutoras intimamente ligadas ao progresso da doença.

Ainda, afirmam que a transição do melanoma *in situ* para invasivo devido a modificações no gene CDKN2A (cyclin-dependent kinase inibitor 2A), é relevante por agir na supressão tumoral. Essas mutações levam a perda da função do gene CDKN2A e, conseqüentemente alterações nos genes SWI/SNF – implicados no enovelamento das cromatinas nas histonas. Já a metastização tumoral se deve a perda da função de PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) e p53.

Além da íntima e expressiva relação entre a exposição crônica e intermitente, ou aguda e intensa ao Sol, têm-se outros fatores de risco associados ao câncer de pele tipo melanoma: história familiar de melanoma, nevos melanocíticos congênitos, nevos displásicos múltiplos, xeroderma pigmentoso, dentre outros (BANDARCHI et al., 2013). Gandini e colaboradores (2005) realizaram uma meta-análise com 10.499 casos e 14.256 controles, e os resultados demonstraram que a presença de 100 nevos

displásicos ou mais possuem risco quase sete vezes maior de desenvolver melanoma do que aqueles que apresentam 15 nevos ou menos (GANDINI et al., 2013).

O diagnóstico do melanoma é clínico-patológico. A assimetria, bordos irregulares, multiplicidade de cores, diâmetro > 6mm e evolução de uma lesão pré-existente são parâmetros clínicos que favorecem o diagnóstico de melanoma. O sistema TNM é utilizado para o estadiamento da doença com base na sua extensão anatômica (VICENTE, 2016).

Quando estabelecido um diagnóstico de melanoma tem-se por objetivo o controle local da neoplasia, a fim de evitar doença metastática. O tratamento é predominantemente cirúrgico (BELFORT, 2010; BRASIL, 2014), apresentando prognóstico favorável e benefícios na sobrevida global nos estádios I e II (HOUGHTON, 2002; BRASIL, 2014).

O melanoma é uma neoplasia resistente à radioterapia, sendo usada para tratamento paliativo e, em alguns casos, adjuvante (BURMEISTER et al., 2012). A quimioterapia consiste no tratamento de escolha, e mais recentemente destaca-se o papel da imunoterapia (HODI et al., 2010).

O prognóstico do melanoma está associado a achados histopatológicos, principalmente a espessura de Breslow em milímetros, e o nível anatômico de Clark. Além destes, considera-se a presença de ulceração epidérmica, número de mitoses/mm², invasões linfática e vascular, sinais de regressão e presença de linfócitos infiltrantes tumorais (LITs). Estudos recentes incluíram a dehidrogenase láctica (DHL) como critério prognóstico da AJCC, sendo que seu valor aumentado no soro dos pacientes com melanoma está relacionado com uma menor sobrevida na doença avançada (BARTLETT et al., 2015). Não há marcadores séricos com especificidade para melanoma (GUO et al., 2015).

A pesquisa do acometimento do linfonodo sentinela é importante para diagnosticar a presença de metástases linfonodais, cujo prognóstico está atrelado à carga tumoral linfonodal. O acometimento linfonodal por doença metastática têm implicado em menores taxas de sobrevida (BALCH et al., 2001; VAN DER PLOEG et al., 2014; VAZQUEZ et al., 2015).

No âmbito do microambiente tumoral é preciso reconhecer a atuação do sistema imune, através de suas vias de recrutamento de células de defesa, inibitórias

– como o a via do PD, e seus receptores, como o PD-L1 – bem como o papel das VEAs (ALVES, GUEDES, 2016).

2.1.7.3 A VIA DO PD E TUMORES

O receptor PD-1 é um eficaz inibidor de células T e atua de forma importante na tolerância periférica. Entretanto, ele pode comprometer as respostas anti-tumorais das células T (ALVES, GUEDES, 2016).

As neoplasias desenvolveram vários meios de evasão do sistema imune, o que prejudica as ações de defesa imunológicas do hospedeiro. A expressão de PD-L1 pelos tumores se dá por processos intrínsecos, de mecanismos oncogênicos, da indução pela célula T ativada ou pela liberação de citocinas (IFN-gama) por linfócitos T ativados. (MORENO, RIBAS, 2015; ALVES, GUEDES, 2016).

As células tumorais, as células do estroma tumoral e as células infiltrativas hematopoiéticas apresentam antígenos tumorais e são capazes de induzir a expressão de PD-L1 na superfície de células neoplásicas vizinhas. Depois de serem ativadas em órgãos linfoides, as células T efetoras tumor-específicas penetram no microambiente tumoral e se tornam LITs (ALVES, GUEDES, 2016).

Por meio da especificidade aos receptores de célula T, os LITs secretam IFN-gama, e este pode provocar a expressão de PD-L1 na superfície das células neoplásicas vizinhas (CHEN, XUE, 2015; MORENO, RIBAS, 2015). A hipótese desse mecanismo é ancorada em estudos imuno-histoquímicos que detectaram a expressão de PD-L1 apenas na superfície de células tumorais vizinhas às células T (CHEN, XUE, 2015), onde se estabelece uma forte correlação entre a expressão de PD-L1 e a presença de LITs em uma variada gama de tumores (SHEN, et al., 2014).

A expressão de PD-L1 geralmente está associada a um mau prognóstico (KIM, EDER, 2014), e a expressão de PD-L1 em melanoma se relaciona ao aumento da taxa de crescimento do tumor (PARDOLL, 2012).

A ligação PD-L1 a seu receptor PD-1 em determinadas células imunes inativa os LITs no microambiente tumoral, através da promoção da apoptose de células T e de células T reativas à neoplasia. Essas ações resultam na progressão tumoral, por ofertarem um meio de escape tumoral do sistema imunológico (MORENO, RIBAS, 2015; ALVES, GUEDES, 2016).

A expressão de PD-L1 em melanomas é indicativa de uma sobrevida global menor, apresentando caráter genético e morfológico distinto e, desse modo, constitui um marcador prognóstico independente em câncer da pele tipo melanoma com peculiaridades morfo-fenotípicas que implicam em maior grau de agressividade e invasão (MASSI et al., 2014).

É conhecimento que os tratamentos com base na imunoterapia apresentam resultados positivos na melhora da sobrevida de pacientes com câncer, incluindo melanoma. Alguns estudos apontam que o bloqueio da via PD-1/PD-L1 pode apresentar benefício clínico, por reativar a resposta imune antitumoral (MORENO, RIBAS, 2015).

Atualmente, dois dos seis agentes bloqueadores de PD-1/PD-L1 já foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) americana – o Nivolumab e o Pembrolizumab (CHEN, XUE, 2015). Outro agente, o Ipilimumab, também foi aprovado pela FDA em virtude de sua eficácia terapêutica em melanomas metastáticos refratários (ZITVOGEL, KROEMER, 2012) e atua bloqueando o receptor CTLA-4 (MORENO, RIBAS, 2015) – responsável pelo início da resposta imune a nível da ativação das células T pela apresentação de antígenos (sendo complementar à via PD, que atua na regulação da atividade efetora das células T nos tecidos periféricos) (DOLAN, GUPTA, 2014; LUKE OTT, 2015).

São necessários mais estudos acerca da expressão de PD-L1 e da presença dos LITs no microambiente tumoral como biomarcadores, a fim de verificar a eficácia e a qualidade da resposta clínica ao uso dos bloqueadores.

2.1.7.4 AS VÊNULAS DE ENDOTÉLIO ALTO E MECA-79

O processo de disseminação dos melanomas para os linfonodos e sítios à distância envolve complexas vias de sinalização e interações entre as células tumorais e o sistema imunológico (AVRAM, 2013).

Numa resposta imune adequada, o fluxo de linfócitos do sangue para o parênquima linfonodal ocorre através de pequenos vasos, chamados de Vênulas de Endotélio Alto (VEAs). As VEAs são frequentemente encontradas em tumores sólidos, e facilitam a infiltração linfocitária no microambiente tumoral. No melanoma a presença de LITs se correlaciona com a regressão e morte das células tumorais, evidenciando

uma resposta imune eficaz e sendo, portanto, um fator prognóstico para a sobrevida global (AVRAM, 2013).

As células endoteliais participam ativamente do processo de inflamação crônica, através da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas. Estudos acerca da recirculação linfocitária descobriram a L-seletina como receptor nos linfócitos. A L-seletina, está associada na interação entre os linfócitos e as VEAs nos linfonodos (GALLACTIN et al., 1983), desencadeando a cascata de adesão e sinalização que resulta no recrutamento de linfócitos para os linfonodos (MYASAKA & TANAKA, 2004).

A descoberta do anticorpo monoclonal MECA-79 – reagente com a família das sialomucinas – possibilitou o estudo das VEAs que apresentam ligantes para L-selectina (UCHIMURA e ROSEN, 2006), e apresenta atividade seletiva para um determinado conjunto de vênulas em tecidos linfoides (MIDDLETON et al., 2005), marcando vênulas pós-capilares apenas se inflamadas (UCHIMURA & ROSEN, 2006). Somente após 2 a 3 dias do início da reação de hipersensibilidade tardia é que se pode constatar a expressão de MECA-79, e portanto pode-se inferir que essa expressão é mediada por fatores inflamatórios (MICHIE et al., 1993).

A presença de alta densidade de VEAs em tumores sólidos humanos se associa com um melhor prognóstico e redução do comprometimento linfonodal (MARTINET et.al., 2012). Estudos demonstram que LITs no melanoma cutâneo consiste num fator prognóstico independente, relacionado com menor agressividade tumoral, melhor sobrevida global, riscos menores de doença metastática e de acometimento de linfonodos sentinela (AZIMI et.al., 2012).

A densidade das VEAs pode representar um biomarcador prognóstico favorável para melanomas. Estudos apontaram que a presença de alta densidade VEAs se associam a melanomas finos, menos invasivos e com sinais de potencial regressão. Entretanto, ainda precisa ser estabelecido o impacto da associação entre as VEAs e os LITs no microambiente tumoral com o prognóstico de pacientes com melanoma (AVRAM et al., 2013).

2.1.7.5 ACOMETIMENTO DO LINFONODO SENTINELA

O linfonodo sentinela (LS) é o primeiro a receber drenagem linfática de um tumor, permitindo avaliar o acometimento linfático regional. A ausência de metástase

no LS indica uma probabilidade >95% de não haver doença metastática naquela cadeia linfonodal (LEE et al., 2008; BRASIL, 2014).

Caso o LS seja acometido pela drenagem tumoral, recomenda-se a linfadenectomia (AL-QURAN et al., 2007; BRASIL, 2014), e se não houver acometimento apenas acompanha-se o paciente periodicamente. A presença de doença metastática na via linfática incorre em pior prognóstico e uma sobrevida em torno de 40% em 5 anos (OMOTI et al., 2007; DIMOPOULOS et al., 2009; BRASIL, 2014).

A retirada dos linfonodos metastáticos, embora não aumente a sobrevida dos pacientes, diminui a recorrência local e traz dados importantes acerca de quais pacientes podem ter benefício com a terapia adjuvante (OMOTI et al., 2007; BOYD et al., 2012).

2.1.8 METODOLOGIA

2.1.8.1 TIPO DE ESTUDO

Será realizado um estudo quantitativo, observacional, transversal, do tipo descritivo analítico.

2.1.8.2 LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO

O estudo será executado no período de maio de 2018 a dezembro de 2018.

2.1.8.3 POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM

A população será constituída por casos de melanomas cutâneos primários diagnosticados em um laboratório de Patologia da região Norte do Rio Grande do Sul, em um período de cinco anos, para avaliar a expressão de PD-L1, densidade de VEAs através da expressão do MECA-79, e status do linfonodo sentinela pelo método imuno-histoquímico.

2.1.8.3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Serão critérios de inclusão do estudo: ressecções completas dos melanomas cutâneos primários dos tipos: melanoma extensivo superficial (MES), melanoma nodular (MN), lentigo maligno melanoma (LMM) e melanoma acral lentiginoso (MAL) e que tenham pesquisa de linfonodo sentinela.

2.1.8.3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Serão excluídos casos enviados como biópsia incisional, sem pesquisa de linfonodo sentinela, melanomas “in situ”, lentigo maligno e lesões metastáticas, demais tipos de melanoma que não preencham critérios para os quatro subtipos histológicos mais frequentes – MES, MN, LMM e MAL –, além dos casos que se verifique 50% ou menos de células neoplásicas viáveis, ou pouco material emblocado em parafina que inviabilize a realização do estudo imuno-histoquímico.

2.1.8.4 VARIÁVEIS E INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS

Será efetuado o levantamento dos dados registrados no sistema de pesquisa de laudos anatomopatológicos do laboratório no período citado. Dos casos selecionados, serão revisados dados referentes ao histórico clínico, como: sexo, idade, cor, localização do (s) tumor (s), dados macroscópicos da lesão e variáveis histopatológicas dos melanomas de acordo com os protocolos da World Health Organization (WHO) e College Americano of Pathologist (CAP 2013).

As variáveis dependentes deste estudo são: a presença da pesquisa de linfonodo sentinela; o melanoma ser do tipo cutâneo primário.

As variáveis independentes: sexo, idade, cor, localização do tumor e subtipo do melanoma – MES, MN, LMM e MAL.

Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações obtidas. Garantir-se-á isto considerando que, na rotina laboratorial, as amostras dos pacientes são arquivadas com um número de registro, e seu nome não é mencionado – o nome do paciente é convertido em um número de registro, e coleta de dados apenas terá acesso a este número – o que assegura o anonimato. As demais informações acerca do sigilo e confidencialidade deste estudo se encontram no item ASPECTOS ÉTICOS e nos formulários e termos presentes nos apêndices deste projeto.

O instrumento de coleta de dados será uma ficha de transcrição de dados, disponível nos apêndices deste projeto (APÊNDICE A).

2.1.8.5 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Para o estudo quantitativo, observacional, transversal, do tipo descritivo analítico serão selecionados os blocos de parafina e as lâminas dos melanomas

cutâneos primários selecionados no referido período, de acordo com os critérios de inclusão. Quando necessário, será realizada nova coloração de hematoxilina e eosina (HE), em casos de lâmina imprópria para releitura. Serão analisados os tipos de melanoma (extensivo superficial, nodular, lentigo maligno melanoma, e melanoma acral lentiginoso), nível de Clark (I a V) e espessura de Breslow (mm). Para a avaliação das variáveis ulceração epidérmica, satelitose, sinais de regressão, infiltrações angiolinfática e perineural será atribuído 0 quando ausente e 1 quando presente. Para atividade mitótica/mm² no componente dérmico será verificado o número de mitoses visualizadas em sete campos de grande aumento, considerando-se duas categorias: até 02 mitoses/mm² e acima de 02 mitoses/mm². Quanto aos LITs, a intensidade será graduada como ausente (0), leve (escore 1, raros linfócitos), moderada (escore 2, infiltração focal do tumor por agregados linfocíticos), acentuada (escore 3, infiltração linfocítica difusa).

O status do linfonodo sentinela será avaliado quanto a presença ou ausência de metástases, através do estudo histopatológico em lâminas coradas em HE, ou através do estudo imuno-histoquímico com os anticorpos MELAN-A e HMB-45.

2.1.8.6 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Após a revisão histopatológica das lâminas em HE dos melanomas, será realizado estudo imuno-histoquímico pelo método polímero para verificar a expressão do MECA-79 e PD-L1. Serão feitos cortes de 4µm do material parafinado e utilizados o anticorpo monoclonal (clone MECA-79; 0,5 mg; Novus Brioological) e o anticorpo monoclonal (clone E1L3N Cell Signaling 0,1 l) (clone PD-L1/CD274 0.1mg; Novus Biological) diluídos em 1:150 e 1:300, respectivamente. Serão utilizados controles positivos para PD-L1 (placenta) e MECA-79 (tonsila palatina). Para revelar a imunomarcção, será utilizado o cromógeno DAB (marrom). A contracoloração será realizada com Giemsa e as lâminas serão analisadas por microscopia óptica. As fotomicrografias serão obtidas com o equipamento ZEISS AxioCam ERc5S.

A densidade de VEAs será avaliada pela expressão do MECA-79. Em casos positivos a densidade de VEAs marcadas será graduada em alta, moderada e baixa.

A avaliação de PD-L1 será obtida pela verificação da marcação de membrana nos melanócitos neoplásicos. Serão considerados positivos os casos com > de 5%

das células marcadas. Será avaliada a porcentagem de células tumorais positivas e a intensidade da imuno-marcação (fraca, moderada ou forte).

2.1.8.7 ANÁLISE DE DADOS

Os dados dos pacientes, referentes às variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas, serão organizados em uma planilha eletrônica e analisados no pacote estatístico PSPP, de distribuição livre.

Será utilizada estatística descritiva para verificar a frequência absoluta total e a frequência relativa percentual dos melanomas cutâneos. Para verificar a associação entre as variáveis serão utilizados testes não paramétricos, como Kruskal-Wallis e Mann-Whitney e o teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5%.

2.1.8.8 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo será realizado através de material arquivado, em blocos de parafina, de um laboratório de Patologia da região Norte do Rio Grande do Sul. Esta pesquisa se compromete, conforme os referenciais da bioética, com a não maleficência, beneficência, justiça e equidade durante a sua realização, não incorrendo em discriminação na seleção das variáveis e materiais a serem utilizados, nem a exposição a riscos desnecessários, e assegurando a privacidade e confidencialidade dos indivíduos cujo material anatomopatológico será estudado. Tendo em vista a metodologia proposta para a realização do presente estudo, foi elaborada a Solicitação de Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), disponível nos apêndices deste projeto (APÊNDICE A).

Este estudo oferece hipotéticos riscos quanto à privacidade e sigilo dos dados sociais (nome, idade, sexo) e anatomopatológicos dos doadores de material biológico – incorrendo na possibilidade de exposição de informações confidenciais cuja divulgação não é autorizada –, os quais tentaremos evitar seguindo a metodologia proposta de identificação numérica. Caso ocorra quebra de sigilo, o presente estudo será interrompido. Os benefícios do estudo implicam nos avanços e estudos sequenciais na grande área da patologia oncológica; na promoção de informações adicionais acerca das técnicas e interpretação da imuno-histoquímica quanto ao PD-L1 e MECA-79; e no fornecimento dos dados obtidos à comunidade em geral, possibilitando a análise destes marcadores prognósticos e seus respectivos empregos

em terapias antitumorais e, assim, contribuindo para o conhecimento e avanço no tratamento de cânceres – beneficiando, então, a comunidade científica e os pacientes acometidos por neoplasias.

2.1.9 RECURSOS

Os anticorpos primários e o método de amplificação serão adquiridos com recursos próprios. As lâminas de HE para o estudo histopatológico e as lâminas de IHQ serão confeccionadas e financiadas pela equipe de pesquisa responsável pelo presente estudo.

ESPECIFICAÇÃO	QUANTIDADE	PREÇO UNITÁRIO (R\$)	TOTAL
Micrótomo	2	19.000,00	38.000,00
Processador automático de tecidos	1	185.000,00	185.000,00
Estufa para processamento (parafina, cortes)	1	3.200,00	3.200,00
Estufa IHQ	1	1.280,00	1.280,00
Panela vapor	1	180,00	180,00
Banho-maria (IHQ)	1	1.739,10	1739,10
Banho-maria (histológico)	1	399,00	399,00
Geladeira	1	598,00	598,00
Câmara úmida (IHQ)	4	99,00	396,00
Microscópio óptico	3	15.000,00	45.000,00
Computador	2	1.900,00	3.800,00
Impressora	1	1.100,00	1.100,00
Pipetador de 1000µL	1	129,00	129,00
Pipetador de 100 µL	2	118,00	236,00
Pipetador de 50 µL	1	115,00	115,00
SUBTOTAL		229.857,10	281.172,10

MATERIAL DE CONSUMO			
Solução de recuperação antigênica-Dako (500 ml)	1	933,30	933,30
Kit DAB-Dako (110 ml)	1	520,00	520,00
Caneta Easy Path	1	400,00	400,00
Silano (500 ml)	1	263,93	263,93
Lâminas histológicas	100	15,00	1.500,00
Lamínulas (caixas com 100)	15	63,00	945,00

Ponteiras (pacote com 1000 para 100µL)	8	49,00	392,00
Ponteiras (pacote com 1000 para 1000 µL)	1	100,00	100,00
PBS (ampola mistura para 1000 ml)	1	100,00	100,00
Formol (bombona 40L)	1	58,00	58,00
Álcool 99% (bombona 5L)	25	16,00	400,00
Xilol (frasco 1000 ml)	20	12,50	250,00
Parafina (pacote com 2kg)	20	14,00	280,00
Acentona P.A (frasco com 1000 ml)	8	38,00	304,00
Cassetes (pacote com 100 unidades)	5	63,00	315,00
Anticorpo monoclonal anti-MECA79	1	2.576,00	2.576,00
Anticorpo monoclonal E1L3N cell signaling	1	3.565,00	3.565,00
Polilink-1 HRP Rat-NM with DAB 18 ml	1	1.947,00	1.947,00
SUBTOTAL		8.489,50	11.232,00
TOTAL		238.346,60	292.404,00

2.1.10 CRONOGRAMA

Data de início: 30/05/18, após aprovação pelo CEP.

Data de finalização: 01/11/18

ATIVIDADES	2017-2018											
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA					18	18	18	18	18	18	18	1
LEVANTAMENTO DE DADOS DO IPPF					18							
ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO					18	18						
ANÁLISE ESTATÍSTICA							18					
CONFEÇÃO DE RESUMOS E							18	18				

REFERÊNCIAS

- AL-QURAN , S. Z. et al. Assessment of bone marrow plasma cell infiltrates in multiple myeloma: the added value of CD138 immunohistochemistry. **Human Pathol**, [S.l.], v. 38, n. 12, p. 1779-87, 2007.
- ALVES, Veridiana S. S.; GUEDES, Virgílio . REVIEW ARTICLE ANTI-PD-1 E ANTI-PD-L1: Novas perspectivas para o tratamento de diversos tipos de câncer. **Sociedade de Patologia do Tocantins**, [S.l.], v. 3, n. 1, 2016.
- AVRAM, G. et al. Correlation between high endothelial vessels and histopathological features of different pigmented lesions. **Current Health Sciences Journal**, [S.l.], v. 40, n. 1, p. 23-26, 2013.
- AZIMI, F. et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, [S.l.], v. 30, n. 21, p. 2678-83, set. 2012.
- B, Bandarchi et al. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. **J Clin Pathol**, [S.l.], v. 66, n. 8, p. 644-8, 2013.
- BALCH, CM et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **J Clin Oncol**, [S.l.], v. 27, n. 36, p. 6199-206, 2009.
- BALCH, CM. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **J Clin Oncol**, [S.l.], v. 27, n. 36, p. 6199-6206, dez. 2009.
- BARTLETT, E. K.; KARAKOUSIS, G. C. Current staging and prognostic factors in melanoma. **Surg Oncol Clin N Am**, [S.l.], v. 24, n. 2, p. 215-27, 2015.
- BELFORT, F.; WAISNTEIN, A. **Melanoma Diagnóstico e Tratamento**. 2. ed. [S.l.]: Lemar, 2010.
- BERMUDEZ, Y. Ultraviolet involvement in melanocyte transformation to melanoma. **BRITISH J Dermatol**, [S.l.], v. 171, n. 6, p. 1289, dez. 2014.
- BERWICK, M. et al. Melanoma Epidemiology and Prevention. In: BERWICK, M. et al. **Cancer Treatment and Research** . [S.l.: s.n.], 2016. p. 17-49.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia**. Brasília: Editora MS-OS, 2014. 74, 75 p.
- BURMEISTER , B. H. et al. Adjuvant radiotherapy versus observation alone for patients at risk of lymph-node field relapse after therapeutic lymphadenectomy for melanoma: a randomised Trial. **Lancet Oncol**, [S.l.], v. 13, n. 6, p. 589-97, 2012.
- CHEN, Lieping; XUE, Han. **Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present and future**. 2015

CLARK, WH, Jr; FROM, L.; BERNARDINO, EA. The Histogenesis And Biologic Behavior Of Primary Human Malignant Melanomas Of The Skin. **Cancer Research**, Boston, Massachusetts, v. 29, n. 3, p. 705-726, mar. 196

DE LIMA VAZQUEZ, V. et al. Molecular profiling, including TERT promoter mutations, of acral lentiginous melanomas. In: **Melanoma Res.** [S.l.: s.n.], 2015
DIMITRI, M. D. Melanoma Cutâneo no Brasil. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, [S.l.], v. 38, 2009.

DOLAN, Dawn E.; GUPTA, Shilpa. PD-1 pathway inhibitors: changing the landscape of cancer immunotherapy. **Cancer Control**, [S.l.], v. 21, n. 3, p. 231-37, 2014.
FLEMMING, Alexandra. PD1 makes waves in anticancer immunotherapy. **Nature**, [S.l.], v. 12, 2012.

GALLATIN, W. M.; WEISSMAN, I. L. ; BUTCHER, E. C. . A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. **Journal of Clinical Oncology**, [S.l.], v. 304, n. 5921, p. 30-4, jul. 1983.

GANDINI, S. et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. **Eur J Cancer**, [S.l.], v. 41, n. 1, p. 45-60, 2005.

GARTNER, L.; HIATT, J. **Atlas Colorido De Histologia**. 6. ed. RIO DE JANEIRO: GUANABARA KOOGAN, 2014. 38 p.

GUO, J. et al. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. **J Clin Oncol**, [S.l.], v. 29, n. 21, p. 2904-9, 2011.

HOD, F. S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **N Engl J Med**, [S.l.], v. 383, n. 8, p. 711-23, 2010.

HOUGHTON, A. N.; POLSKY, D. Focus on melanoma. **Cancer Cell**, [S.l.], v. 2, n. 4, p. 275-8, 2002.

INCA: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/def_nicao>. Acesso em: 20 ago. 2017.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 558 p.

KIM, J. W.; EDER, J. P. **Prospects for targeting PD-1 and PD-L1 in various tumor types**. Disponível em: <<http://www.cancernetwork.com/oncology-journal/prospects-targeting-pd-1-and-pd-l1-various-tumor-types>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

LEE, S. Y. et al. Alterations of high endothelial venules in primary and metastatic tumors are correlated with lymph node metastasis of oral and pharyngeal carcinoma. [S.l.], p. 823-25, jul. 2014.

MARTINET, L. et al. High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions. **Oncolmunology**, [S.l.], v. 1, p. 829-39, jul. 2012.

MASSI, D. et al. PD-L1 marks a subset of melanomas with a shorter overall survival and distinct genetic and morphological characteristics. **Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, [S.l.], v. 25, p. 2433-2442, set. 2014.

MATHEUS, Luiz Guilherme de Moraes; VERRI, Beatriz Helena de Mattos Araujo . Aspectos Epidemiológicos Do Melanoma Cutâneo. **Revista Ciência e Estudos Acadêmicos de Medicina - Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT (Cáceres)**, [S.l.], n. 3, p. 10-24, jul. 2015.

MICHIE, S. A. et al. The human peripheral lymph node vascular addressin. An inducible endothelial antigen involved in lymphocyte homing. **The American Journal of Pathology**, [S.l.], v. 143, p. 1688-98, 1993.

MIDDLETON, J. et al. A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, Von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. **Journal of Pathology**, [S.l.], v. 260, p. 260-68, 2005.

MIYASAKA, M.; TANAKA, T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. **Nat Rev Immunol**, [S.l.], v. 4, n. 5, p. 360-70, maio. 2004.
MORENO, Homet B.; RIBAS, A. Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. **British Journal of Cancer**, [S.l.], v. 112, p. 1421-1427, 2015.

MULLARD, Asher. New checkpoint inhibitors ride the immunotherapy tsunami. **Nature**, [S.l.], v. 12, p. 489-92, 2013.

OMOTI, A. E.; OMOTI, C. E. Ophthalmic manifestations of multiple myeloma. **West Afr J Med**, [S.l.], v. 26, n. 4, p. 265-8, 2007.

PARDOLL, Drew M. Drew M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews**, [S.l.], v. 12, p. 252-64, 2012.

SHAIN, A. H. et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. **N Engl J Med**, [S.l.], v. 373, n. 20, p. 1926-36, 2015.

SHEN, Jacson K. et al. Programmed cell death ligand 1 expression in osteosarcoma. **American Association for Cancer Research**, [S.l.], p. 1121-15, 2014.

TSAO, H. et al. Early detection of melanoma: reviewing the ABCDEs. **J Am Acad Dermatol**, [S.l.], v. 72, n. 4, p. 717-23, abr. 2015.

UCHIMURA, K.; ROSEN, D. Sulfated L-selectin ligands as a therapeutic target in chronic inflammation. **TRENDS in Immunology**, [S.l.], v. 27, n. 12, p. 559-65, 2006.

VAN DER PLOEG, A. P. et al. The prognostic significance of sentinel node tumour burden in melanoma patients: an international, multicenter study of 1539 sentinel node-positive melanoma patients. **Eur J Cancer**, [S.l.], v. 50, n. 1, p. 111-20, 2014.

VICENTE, Anna Luiza Silva Almeida. **Perfil molecular de melanomas cutâneos e de mucosas**. 2016. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Saúde) Fundação Pio XII Hospital de Câncer de Barretos, [S.l.], 2016.

ZITVOGEL, Laurence; KOREMER, Guido. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. **Oncolmmunology**, [S.l.], v. 1, n. 8, p. 1223-25,2012.

APÊNDICE A - PLANILHA DE TRANSCRIÇÃO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIDA

NOME DO COLETOR DOS DADOS:		
Nº DO REGISTRO:		
IDADE:	COR: () BRANCA - 0 () PARDA -1 () PRETA -2 () AMARELA -3 () INDÍGENA -4	SEXO: () FEMINNO () MASCULINO
SUBTIPO: () MES - 1 () MN - 2 () LMM - 3 () MAL - 4		
NÍVEL DE CLARK: () I/1 () II/2 () III/3 () IV/4 () V/5		
ESPESSURA DE BRESLOW (mm):		
ULCERAÇÃO EPIDÉRMICA: () 0 () 1		
SATELITOSE: () 0 () 1		
SINAIS DE REGRESSÃO: () 0 () 1		
INFILTRAÇÕES ANGIOLINFÁTICAS: () 0 () 1		
INFILTRAÇÕES PERINEURAIS: () 0 () 1		
MITOSES/mm ² : () 0 () 1		
INTENSIDADE DOS LITs: () 0 () 1 () 2 () 3		
STATUS DO LINFONODO SENTINELA – METÁSTASE: () 0 () 1		
DENSIDADE DE VEAs (MECA-79): () 0 () 1		
SE MECA-79 +: () 1 () 2 () 3		
PD-L1: () < 1% () < 5% - 1 () >5% - 2		
PORCENTAGEM DE CELULAS TUMORAIS POSITIVAS:		%
INTESIDADE DA IMUNO-MARCAÇÃO: () 1 () 2 () 3		

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

SOLICITAÇÃO DE DISPENSA

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFFS

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIDA

Esta pesquisa será desenvolvida por Ana Julia Delazeri, discente de Graduação em Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus de Passo Fundo/RS sob orientação da Prof^o. Josiane Borges Stolfo.

O objetivo central do estudo é avaliar o padrão de expressão do PD-L1, a densidade de vasos de endotélio alto e o status do linfonodo sentinela em pacientes com melanoma cutâneo primário e, desse modo, correlacionar a expressão do PD-L1 e densidade de vasos de endotélio alto, e o status do linfonodo sentinela com a sobrevida dos pacientes com melanoma cutâneo primário, objetivando usá-los como indicadores prognósticos.

No Brasil, o câncer (CA) de pele é o mais frequente dos tumores malignos, representando cerca de 30% dos casos – sendo apenas 3% do tipo melanoma. Dentre os vários tipos de CA de pele, o melanoma é o mais agressivo devido a sua origem neuroectodérmica, fato este que potencializa a capacidade de gerar metástases via linfática e/ou hematogênica (BRASIL, 2014; BRASIL 2017)

Esta pesquisa justifica-se tendo em vista o número crescente de casos e as altas taxas de mortalidade do melanoma cutâneo primário, sendo de sobremaneira relevante o estudo de mecanismos que oportunizem inferir o prognóstico dos pacientes acometidos a fim de se estabelecer uma terapêutica adequada.

Serão incluídos no estudo pacientes com melanoma cutâneo primário. A amostra, não probabilística, de conveniência será selecionada segundo os seguintes critérios: ressecções completas dos melanomas cutâneos primários dos tipos: melanoma extensivo superficial (MES), melanoma nodular (MN), lentigo maligno

melanoma (LMM) e melanoma acral lentiginoso (MAL) e que tenham pesquisa de linfonodo sentinela. Serão excluídos casos enviados como biópsia incisional, sem pesquisa de linfonodo sentinela, melanomas “in situ”, lentigo maligno e lesões metastáticas, demais tipos de melanoma que não preencham critérios para os quatro subtipos histológicos mais frequentes – MES, MN, LMM e MAL –, além dos casos que se verifique 50% ou menos de células neoplásicas viáveis, ou pouco material embocado em parafina que inviabilize a realização do estudo imuno-histoquímico.

A coleta dos dados será realizada a partir da base de dados de um laboratório da região norte do Rio Grande do Sul e as variáveis analisadas serão: expressão de PD-L1, MECA-79 e status do linfonodo sentinela.

Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações obtidas. Garantir-se-á isto considerando que, na rotina laboratorial, as amostras dos pacientes são arquivadas com um número de registro, e seu nome não é mencionado – o que assegura o anonimato. Se, porventura, houver identificação do sujeito, o presente estudo será interrompido. Contudo, ainda assim há o risco de identificação do paciente. Esse risco será minimizado, uma vez que o nome do paciente é convertido em um número de registro, e coleta de dados apenas terá acesso a este número. Devido à natureza do estudo, não existem benefícios diretos para o participante. Contudo, há o benefício indireto para a comunidade. Os benefícios do estudo implicam nos avanços e estudos sequenciais na grande área da patologia oncológica; na promoção de informações adicionais acerca das técnicas e interpretação da imuno-histoquímica quanto ao PD-L1 e MECA-79; e no fornecimento dos dados obtidos à comunidade em geral, possibilitando a análise destes marcadores prognósticos e seus respectivos empregos em terapias antitumorais e, assim, contribuindo para o conhecimento e avanço no tratamento de cânceres – beneficiando, então, a comunidade científica e os pacientes acometidos por neoplasias.

Este estudo será realizado de acordo com a Resolução nº466/2012 da Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP). Será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), por meio do sistema eletrônico Plataforma Brasil. Para tanto, será solicitada Ciência e Concordância da instituição onde será realizada a coleta dos dados e a seleção das amostras. Considerando-se que serão utilizados dados cadastrais e amostras biológicas armazenadas em biobanco de pacientes atendidos em período anterior a

realização do estudo, que esses não sofrerão intervenção direta e que os mesmos não mantêm atendimento regular na instituição, dificultando o contato com a equipe de pesquisa, solicita-se dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Passo Fundo, dezembro de 2017.

Nome completo e legível do pesquisador responsável:

Assinatura do Pesquisador Responsável

APÊNDICE C – TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE DADOS DO BIOBANCO

O presente termo tem por objetivo a autorização de utilização de dados do biobanco (tecido emblocado em parafina e cortes de tecido parafinado em lâminas coradas em Hematoxilina-Eosina) e ficha cadastral dos pacientes, provenientes do INSTITUTO DE PATOLOGIA DE PASSO FUNDO –RS, para uso no trabalho de conclusão de curso (TCC) intitulado como “AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA” da faculdade de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul campus Passo Fundo-RS. O projeto será realizado pela acadêmica Ana Julia Delazeri, sob orientação da Prof^o. Josiane Borges Stolfo.

Local e data

Instituto de Patologia de Passo Fundo-RS

Pesquisador Responsável

APÊNDICE D - TERMO DE COMPROMISSO PARA USO DE DADOS

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIDA

O(s) pesquisador(es) do projeto acima identificado(s) assume(m) o compromisso de:

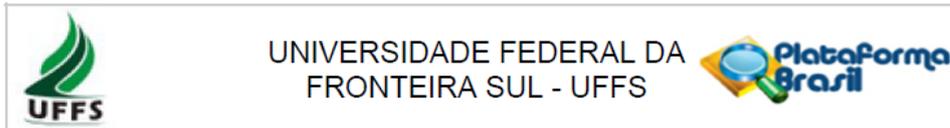
- I. Preservar a identidade dos pacientes cujos dados serão coletados;
- II. Assegurar que as informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do projeto em questão;
- III. Assegurar que as informações somente serão divulgadas de forma anônima, não sendo utilizadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o sujeito da pesquisa.

Assinatura do Pesquisador Responsável

Passo Fundo, dezembro de 2017

APÊNDICE E – PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIDA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIDA

Pesquisador: JOSIANE BORGES STOLFO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 84309618.5.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.658.074

Apresentação do Projeto:

Já apresentado em parecer anterior.

Objetivo da Pesquisa:

Já apresentado em parecer anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já apresentado em parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora incluiu as modificações relativas às pendências indicadas pelo CEP no documento 'informações básicas do projeto'.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora atendeu todas as pendências indicadas pelo CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há impedimentos éticos ao desenvolvimento do estudo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador(a)

A partir desse momento o CEP passa a ser corresponsável, em termos éticos, do seu projeto de pesquisa – vide artigo X.3.9. da Resolução 466 de 12/12/2012.

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
 Bairro: Área Rural CEP: 89.815-899
 UF: SC Município: CHAPECO
 Telefone: (49)2049-3745 E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



Continuação do Parecer: 2.658.074

Fique atento(a) para as suas obrigações junto a este CEP ao longo da realização da sua pesquisa. Tenha em mente a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, a Norma Operacional CNS 001/2013 e o Capítulo III da Resolução CNS 251/1997. A página do CEP/UFFS apresenta alguns pontos no documento "Deveres do Pesquisador".

Lembre-se que:

1. No prazo máximo de 6 meses, a contar da emissão deste parecer consubstanciado, deverá ser enviado um relatório parcial a este CEP (via NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil) referindo em que fase do projeto a pesquisa se encontra. Veja modelo na página do CEP/UFFS. Um novo relatório parcial deverá ser enviado a cada 6 meses, até que seja enviado o relatório final.
2. Qualquer alteração que ocorra no decorrer da execução do seu projeto e que não tenha sido prevista deve ser imediatamente comunicada ao CEP por meio de EMENDA, na Plataforma Brasil. O não cumprimento desta determinação acarretará na suspensão ética do seu projeto.
3. Ao final da pesquisa deverá ser encaminhado o relatório final por meio de NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil. Deverá ser anexado comprovação de publicização dos resultados. Veja modelo na página do CEP/UFFS.

Em caso de dúvida:

Contate o CEP/UFFS: (49) 2049-3745 (8:00 às 12:00 e 14:00 às 17:00) ou cep.uffs@uffs.edu.br;

Contate a Plataforma Brasil pelo telefone 136, opção 8 e opção 9, solicitando ao atendente suporte Plataforma Brasil das 08h às 20h, de segunda a sexta;

Contate a "central de suporte" da Plataforma Brasil, clicando no ícone no canto superior direito da página eletrônica da Plataforma Brasil. O atendimento é online.

Boa pesquisa!

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1070952.pdf	11/05/2018 11:53:20		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETODEPESQUISAMODIFICADO.pdf	11/05/2018 11:52:39	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
 Bairro: Área Rural CEP: 89.815-899
 UF: SC Município: CHAPECÓ
 Telefone: (49)2049-3745 E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



Continuação do Parecer: 2.658.074

Outros	CARTADEPENDENCIASMODIFICADO.pdf	11/05/2018 11:52:15	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMAMODIFICADO.pdf	20/04/2018 22:31:36	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	24/02/2018 10:41:28	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Outros	PESQUISANAOCIADA.pdf	24/02/2018 10:39:31	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	USODEDADOS.pdf	24/02/2018 10:27:17	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	toledispensa.pdf	24/02/2018 10:25:38	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Orçamento	RECURSOSDETALHADO.pdf	24/02/2018 10:24:55	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biobanco.pdf	24/02/2018 10:23:08	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CHAPECO, 16 de Maio de 2018

Assinado por:

Valéria Silvana Faganello Madureira
(Coordenador)

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
 Bairro: Área Rural CEP: 89.815-899
 UF: SC Município: CHAPECO
 Telefone: (49)2049-3745 E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br

2.2 RELATÓRIO DE PESQUISA

2.2.1 APRESENTAÇÃO

Este relatório de pesquisa foi desenvolvido para detalhar as atividades referentes ao Trabalho de Conclusão de Curso, requerido pela Universidade Federal da Fronteira Sul para graduação em Medicina, cujo tema é *Avaliação da Expressão de PD-L1 e MECA-79 em Melanomas Cutâneos Primários: Estudo de Acometimento do Linfonodo Sentinela e Análise de Sobrevida*.

O melanoma é a neoplasia com maior índice de mortalidade entre os cânceres (CA) de pele. Embora represente apenas cerca de 3% dos casos de câncer de pele, é responsável por aproximadamente 95% das mortes por esta causa. A radiação solar intermitente e aguda está intimamente ligada à gênese do melanoma, sendo um dos maiores fatores de risco (BRASIL, 2014; BRASIL 2017; BERMUDEZ, 2014; VICENTE, 2016).

O sistema imunológico do hospedeiro constitui um importante mecanismo de defesa contra a agressão tumoral, lançando mão de células especializadas – como os linfócitos infiltrantes tumorais (LITs). Há hipóteses de que vasos especializados, denominados Veias de Endotélio Alto (VEA) e encontrados em diversos tumores sólidos e melanomas, facilitem a passagem de linfócitos até o microambiente tumoral. As VEA, por sua vez, são identificadas pelo anticorpo específico MECA-79. A inativação dos LITs no sítio específico do tumor ocorre em razão da ligação do PD-L1 (program cell death ligand-1) ao seu receptor PD1 (program cell death), constituindo uma das mais relevantes vias de escape tumoral. Visto isso, infere-se a importância prognóstica da expressão de MECA-79 e PD-L1 (MULLARD, 2013; KIM e EDER, 2014; MARTINET et al., 2012, SAKAI et. al., 2014).

Outro fator que prediz, com elevada precisão, a sobrevida do paciente é o acometimento ou não do linfonodo sentinela por doença metastática – quando presente delinea prognóstico reservado.

A aferição da expressão de marcadores imuno-histoquímicos tem se mostrado um instrumento valioso na avaliação do prognóstico de pacientes portadores de diversos tumores, dentre eles o melanoma (VICENTE, 2016).

Uma correta identificação e estratificação da doença pode influenciar na escolha da terapêutica adotada e apresentar benefícios na sobrevida global dos pacientes (VICENTE, 2016).

2.2.2 DESENVOLVIMENTO

2.2.2.1 LOGÍSTICA DA COLETA DE DADOS

O presente estudo foi submetido à Plataforma Brasil em março de 2018 e aprovado em maio do ano de 2018, conforme o parecer anexado na seção de apêndices (apêndice E). Após a aprovação – que se ocorreu após duas sugestões de mudança em proposições metodológicas – o trabalho foi realizado no Instituto de Patologia de Passo Fundo, na unidade do Hospital da Cidade de Passo Fundo. O levantamento de dados se deu a partir do banco de dados do referido laboratório, selecionando apenas àqueles que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão já citados na metodologia do Projeto de Pesquisa.

Este levantamento de dados foi realizado pela acadêmica Ana Julia Delazeri, e a coordenadora do presente projeto Josiane Borges Stolfo, em um período de 3 horas.

Usando critério de inclusão “pesquisa de linfonodo sentinela”, foram encontrados 73 casos. Destes 73, foram selecionados todos aqueles que possuíam a confirmação da pesquisa de linfonodo sentinela por imuno-histoquímica, a fim de reduzir os resultados falsos-negativo, e o número foi reduzido para 65 casos. Ainda, dos 65 casos, foram incluídos apenas aqueles cuja lesão primária estava descrita no laudo anatomopatológico e, então, reduziu-se o número de casos para 50. Dos 50 casos, ao revisar as descrições dos laudos anatomopatológicos, subtraiu-se ainda 11 casos cujas informações necessárias (descritas no apêndice A) estavam imprecisas e/ou ausentes. Estes 39 casos compõem a amostra do estudo, divergindo da estimativa inicial de 80 casos.

Os dados foram impressos e transcritos para uma ficha de transcrição cujo modelo está anexado nos apêndices do projeto (apêndice A), com codificação numérica para cada variável analisada, e posteriormente digitados em uma planilha eletrônica.

Com os casos já selecionados, realizou-se o estudo imuno-histoquímica das lâminas histopatológicas, avaliando os parâmetros relevantes para esta pesquisa. Os dados histopatológicos também foram transcritos para uma ficha eletrônica onde cada critério foi codificado numericamente, quanti e qualitativamente.

2.2.2.2 PERÍODO DA COLETA DOS DADOS

A coleta de dados foi realizada entre os meses de maio e junho de 2018, conforme o cronograma do projeto. Não houveram intercorrências durante a coleta, sendo cumpridos todos os prazos dentro do previsto.

2.2.2.3 PERDAS E RECUSAS

As perdas ocorridas durante a execução do projeto limitaram-se aos casos excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão e/ou não conterem informações suficientes para serem incluídos no estudo.

Tendo em vista a análise de uma quantidade suficiente de variáveis clinopatológicas e o comprometimento do LS optou-se pela não análise de sobrevida, visto a grande possibilidade de não ter acesso fiel a este dado. Portanto, no artigo, alterou-se o título para ***“Avaliação da expressão em PD-L1 E MECA-79 em melanomas cutâneos primários: estudo de acometimento do linfonodo sentinela”***.

2.2.2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo se mostrou relevante, tanto para o conhecimento científico quanto para a formação e aprendizagem dos pesquisadores. Os resultados descritos no artigo endossam alguns dados já relatados na literatura. Por outro lado, trazem associações que podem servir de base para novos estudos, objetivando o maior conhecimento sobre melanoma e as variáveis que influenciam no prognóstico, bem como o estabelecimento de terapêuticas adequadas e efetivas.

3 ARTIGO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO SENTINELA

Ana Julia Delazeri ¹, Josiane Borges Stolfo ²

1. Discente do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul – Passo Fundo.
2. Médica Patologista pelo Instituto de Patologia de Passo Fundo, docente do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul – Passo Fundo, Mestre em Bioexperimentação pela Universidade de Passo Fundo.

RESUMO

Objetivos: Muitos estudos têm destacado o papel imunogênico do melanoma, da presença de linfócitos infiltrantes tumorais (LITs), bem como a importância dos mecanismos de escape tumoral do sistema imune, como a hiperexpressão do ligante 1 de morte celular programada (PD-L1) pelas células tumorais. Vênulas de Endotélio Alto (VEA) são vasos especializados que facilitam a migração de linfócitos ao tumor, reconhecidos pelo marcador MECA-79. O objetivo do presente estudo foi verificar a associação da densidade de VEA e a expressão de PD-L1 em melanomas cutâneos primários com o status do linfonodo sentinela (LS), e com demais parâmetros clínico-patológicos, como idade, sexo, localização da lesão, tipo do melanoma, espessura de Breslow, presença de mitoses e de ulceração.

Material e Métodos: Nos arquivos do biobanco de dados do laboratório de patologia, foram pesquisados casos de melanoma cutâneo primário dos tipos extensivo superficial (MES), nodular (MN), lentigo maligno melanoma (LMM) e melanoma acral lentiginoso (MAL), que tinham pesquisa de linfonodo sentinela. Nas 39 amostras selecionadas, a densidade de VEA MECA79+ e expressão de PD-L1 foram avaliadas por imuno-histoquímica com anticorpos específicos.

Resultados: Entre os 73 casos inicialmente selecionados, 39 foram incluídos na análise. Destes, a densidade de VEAs e expressão de PD-L1 foram avaliadas por imuno-histoquímica, sendo detectados em 84,2% e 66,6% dos melanomas, respectivamente. Associações positivas foram encontradas entre nível de expressão do PD-L1 e positividade do LS, positividade do LS com a espessura de Breslow e com a presença de mitoses. Da mesma forma, verificou-se que o comprometimento do LS foi mais frequente em melanomas com menor intensidade de LITs.

Conclusão: A quantificação de VEA, a verificação da expressão de PD-L1 e suas

associações com o status do LS, permitem maiores informações acerca das características histopatológicas prognósticas em melanomas. Os resultados obtidos nesse estudo são de interesse, pois poderão permitir o aperfeiçoamento dos estudos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, no sentido de estímulo da resposta imune antitumoral através da facilitação da migração de LITs através das VEA e da desativação do mecanismo de escape tumoral do sistema imune pelo bloqueio do eixo PD1/PD-L1.

Palavras-chave: melanoma, linfonodo sentinela, vênulas de endotélio alto, MECA-79, PD-L1.

Introdução

Melanomas cutâneos são neoplasias altamente agressivas, com origem em melanócitos, e elevado potencial metastático. Nas últimas décadas, as taxas de mortalidade são elevadas e sua incidência vem aumentando em todo o mundo ^{1,2,3}.

A pesquisa do status do linfonodo sentinela em melanomas cutâneos primários é de importância prognóstica e para definição de estratégia adequada de tratamento após a ressecção da lesão primária. Sabe-se que o comprometimento do linfonodo sentinela tem impacto direto tanto na sobrevida livre de recorrência e global^{3,4,5}.

Vários estudos têm destacado a capacidade imunogênica do melanoma e a importância dos linfócitos infiltrantes tumorais (LITs) como manifestação da resposta imune do hospedeiro ^{4,5}. A presença dos LITs em melanomas cutâneos primários tem impacto favorável na sobrevida global do melanoma, com menor chance de desenvolvimento de metástases em linfonodos regionais, sendo um marcador de resposta imune ⁴⁻⁶. Assim, tem sido destacado o papel das Vênulas de Endotélio Alto (VEAs) em melanomas, e também em outros tumores sólidos ^{7,8}. Com a descoberta de L-selectina como receptor nos linfócitos, estudos adicionais revelaram que esta proteína faz a mediação da interação e o rolamento dos linfócitos nos VEA, que facilita o recrutamento dos linfócitos para os linfonodos ^{9,10}. Estas vênulas podem ser reconhecidas pela expressão endotelial do marcador específico MECA-79 ^{7,9-14}, detectado por um anticorpo monoclonal (mAb) que reage com a família das sialomucinas, coletivamente conhecidas como *Peripheral Node Adressin (PNAd)*, sendo uma ferramenta para o estudo dos VEA que expressam ligantes para L-selectina ^{13,14,15}.

No estudo do microambiente tumoral, sabe-se da existência de mecanismos de escape tumoral do sistema imune, com consequente progressão tumoral ²⁷⁻²⁹. Um desses mecanismos é a superexpressão do ligante 1 de morte celular programada (*Programmed Cell Death Ligand-1 – PD-L1*). A ligação de PD-L1 ao seu receptor *Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1)*, presente nas células imunes, leva à inativação dos LITs no microambiente tumoral, sugerindo que a expressão do PD-L1 pelas células tumorais, avaliado por imuno-histoquímica (IHQ), tem valor prognóstico adverso em vários tumores sólidos, incluindo o melanoma ^{16-20,20-23}.

Neste sentido, estudos em imunoterapia evidenciam que o possível bloqueio do eixo PD-1/PD-L1 pode reativar a resposta imune antitumoral, com benefício clínico, por impedir a progressão tumoral e as chances de metástases ^{24,25-27}.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a densidade de VEA e a expressão de PD-L1 em melanomas cutâneos primários e verificar a associação destes possíveis biomarcadores com o status do linfonodo sentinela e com demais parâmetros clinicopatológicos de importância prognóstica, como idade, sexo, tipo do melanoma, sítio do tumor, espessura de Breslow, presença e grau de LITs, presença de mitoses no componente dérmico e ulceração.

Material e Métodos

Foi realizado estudo retrospectivo com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Fronteira Sul, RS, Brasil, sob o número : 84309618.5.0000.5564. Foram analisadas 39 amostras de pacientes com melanoma cutâneo primário no período de maio a novembro de 2018, provenientes de um laboratório de Patologia de Passo Fundo-RS. Os casos foram selecionados de espécimes provenientes de excisão completa das lesões de melanomas dos tipos extensivo superficial (MES), nodular (MN), lentigo maligno melanoma (LMM) ou melanoma acral lentiginoso (MAL), que incluíam pesquisa de linfonodo sentinela. Amostras provenientes de biópsia incisional, melanomas “*in situ*”, que não fossem classificados nos 4 subtipos histológicos descritos acima ou que não tivessem pesquisa de linfonodo sentinela foram excluídos do estudo. As características clínicas analisadas incluíram idade, sexo dos pacientes e sítio anatômico da lesão.

Os espécimes cirúrgicos dos pacientes foram fixados em formalina tamponada a 10% e montados em parafina. O diagnóstico de melanoma foi obtido através da análise das secções tumorais, coradas pelo método da hematoxilina & eosina (H&E), e observados em microscópio óptico. As características histopatológicas analisadas foram: subtipo histológico (MES, MN, LMM e MAL), espessura de Breslow (mm), presença e grau de infiltração linfocítica, presença/ausência de ulceração e mitoses. A espessura de Breslow foi avaliada de acordo com os critérios do *American Joint Committee Cancer (AJCC 2017)*, considerando-se o ponto de corte para melanomas finos e espessos a medida de 0,8mm (milímetro)

com ocular micrométrica²⁸. A intensidade da infiltração linfocítica foi avaliada semi-quantitativamente de 0 a 3: 0= ausente (nenhuma infiltração linfocítica); 1= leve (linfócitos presentes focalmente na área peritumoral sem extensão intratumoral); 2= moderado (linfócitos presentes na área peritumoral com proeminente extensão intratumoral); 3= acentuado (marcada infiltração de linfócitos nas áreas intra e peritumoral)²⁹.

Para a análise por IHQ foram selecionados os blocos de parafina das secções de H&E, previamente analisadas, em cortes de 3µm. Para a detecção das VEAs e da expressão do PD-L1 foram utilizados os anticorpos monoclonais *Peripheral Node Addressin* (clone MECA-79 0,5mg, Novus Biological®) e anti- PD-L1 (clone E1L3N 0,1mg, CellSignaling®). As lâminas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários em temperatura ambiente nas diluições 1:150 e 1:300 respectivamente. Em todas as lâminas, foram incluídos controles positivos para MECA-79 (tonsila palatina) e para PD-L1 (placenta). A imunocoloração foi revelada pelo cromógeno diaminobenzidina (DAB) e todas as lâminas foram contracoloradas com Giemsa. A seguir, as amostras foram analisadas em microscópio óptico Zeiss Axio ScopeA.1 e as fotomicrografias obtidas com o equipamento Bióptica 5.0.

O número absoluto de vasos MECA-79 positivos foi quantificado na maior área para cada secção tumoral. A densidade de vasos, expressa pelo número de vasos positivos por mm² foi calculada semi-quantitativamente para cada caso, com base em estudos prévios^{7,30}.

A análise da expressão do PD-L1 foi realizada semi-quantitativamente, através da porcentagem (%) de células tumorais (CT) marcadas. As amostras foram consideradas positivas quando a imunomarcção membranar, completa ou incompleta, de qualquer intensidade foi observada em $\geq 1\%$ das CT. Para cada secção imuno-histoquímica, foram usados os seguintes escores (EIHQ): EIHQ 0: < de 1% EIHQ 1: < 5% EIHQ 2: $\geq 5\%$. As intensidades da coloração membranar nas CT foram avaliadas como fraca (1), moderada (2) e intensa (3).

A análise estatística foi realizada com o pacote SPSS 2.0. Foram verificadas as frequências absoluta e relativa das características clinicopatológicas do tumor. A associação da densidade dos VEA (MECA79 +) e da expressão de PD-L1 com as variáveis clinicopatológicas foi realizada usando-se os testes não paramétricos de

Mann-Whitney (2 grupos) e Kruskal-Wallis. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Um total de 39 casos foram incluídos no estudo. A média de idade dos pacientes foi de 58,1 anos, com desvio padrão de 11,2. Acerca do sexo, 46,15% são mulheres e 53,85% homens. O sítio mais frequente do melanoma foi tronco (51,28%), seguido pelos membros superiores (38,46%). O tipo histológico predominante foi o MES (82,05%), seguido pelo MN (10,26%), MAL (7,69%). Não houve nenhum caso de LMM na amostra estudada.

A média da espessura de Breslow foi de 2,28mm, sendo que os valores $> 2,01$ mm e < 4 mm representaram 35,9% dos casos. LITs foram presentes em 97,44% e ulceração em 46,15%. Mitoses foram detectadas em 20 casos (51,28%). Verificou-se status positivo de linfonodo sentinela em 46,15% dos casos (18/39). As características clinicopatológicas dos melanomas estão sumarizadas na Tabela 1.

Vênulas MECA-79-positivas foram observadas em 84,62% das amostras. A média da densidade de todos os vasos MECA-79-positivos/mm² da área tumoral foi de 1,42 vasos por mm². (Figura 1A e 1B). A análise da associação da densidade de VEA no tumor primário com o status do LS não demonstrou significância estatística ($p = 0,645$).

Expressão de PD-L1 pelas CT foi observada em 66,6% (26/39) dos espécimes estudados, sendo 20,51% $< 5\%$ e 46,15% $\geq 5\%$ (Figura 2A e 2B). A associação entre a expressão do PD-L1 e o status do linfonodo sentinela estão demonstrados na Figura 3. Em números totais, a expressão de PDL1 negativa ocorreu em 33,33% dos casos, ao passo que 20,51% tiveram baixa expressão e 46,15% dos casos obtiveram alta expressão de PDL1.

O estudo de associação entre o acometimento de LS e a intensidade dos LITs obteve significância estatística ($p=0,025$), e demonstrou que, dos 18 casos com LS positivo, 11 casos apresentaram LITs de leve intensidade, correspondendo a 61,11%; e 7 casos apresentaram LITs de moderada intensidade, correspondendo a 38,89%. Nos casos com LS positivo, não houve LITs ausentes e nem LITs acentuados. Entre

Tabela 1 . Frequências das características clinicopatológicas de melanomas cutâneos primários

	N	%
Sexo		
Masculino	21	53,85
Feminino	18	46,15
Idade		
≤ 55	15	38,46
> 55	24	61,54
Sítio anatômico		
Cabeça e pescoço	3	7,69
Tronco	20	51,28
Extremidade inferior	1	2,56
Extremidade superior	15	38,46
Tipo histológico		
MÉS	32	82,05
MN	4	10,26
LMM	0	0
MAL	3	7,69
Espessura de Breslow		
Até 1mm	9	23,08
1,01 a 2,0 mm	13	33,33
2,01 a 4,0mm	14	35,90
> 4,0 mm	3	7,69
Ulceração		
Presente	18	46,15
Ausente	21	53,85
PDL1		
Negativo	21	53,85
Baixa Expressão	8	20,51
Alta Expressão	18	46,15
DVEAs		
Mínimo	00	-
Máximo	4,22	-
Infiltração Linfocítica		
Ausente	1	2,56
Leve	22	56,41
Moderada	14	35,90
Acentuada	2	5,13
Mitoses		
Ausente	19	48,72
Presente	20	51,28

DVEA: Densidade das Vênulas de Endotélio Alto.

os casos onde o LS não foi acometido (21/39), encontrou-se LITs ausente em 4,76%, de leve intensidade em 52,38%, moderada intensidade em 33,3% e acentuada intensidade em 9,52%.

Os resultados demonstraram que o acometimento de linfonodo sentinela ocorreu em 46,15% dos casos (18/39).

Do total de casos cujo status do LS foi positivo (46,15%), 77,78% corresponderam ao MES, 16,67% ao MN e 5,56% ao MAL. Já nos casos em que o status do LS foi negativo (21/39, equivalendo a 53,85% do total), verificou-se que 85,71% corresponderam ao MES, 4,76% ao MN e 9,52% ao MAL. Na amostra estudada, não houve nenhum caso de LMM.

No MES, a positividade do LS foi em 43,75% dos casos, enquanto que para o MN foi de 75% e 33,33% para o MAL. O subtipo LMM não compôs a amostra deste estudo. As relações entre a positividade/negatividade do LS com os subtipos histológicos podem ser verificadas na Tabela 2.

A relação entre o acometimento do LS e a expressão de PDL1 mostrou que, nos casos onde o status do LS foi positivo

(46,15% do total), a expressão de PDL1 foi negativa em 5,56%, baixa em 16,67% e alta em 77,78%. Nos casos em que o status do LS foi negativo (53,85%), a expressão de PDL1 foi negativa em 57,14% dos casos, enquanto que em 23,81% foi baixa e em 19,05% foi alta.

Os resultados da associação entre o status positivo do LS e o tipo de tumor, a espessura de Breslow, ulceração epidérmica, presença de mitoses, densidade de VEAs e PD-L1 podem ser verificados na Tabela 3.

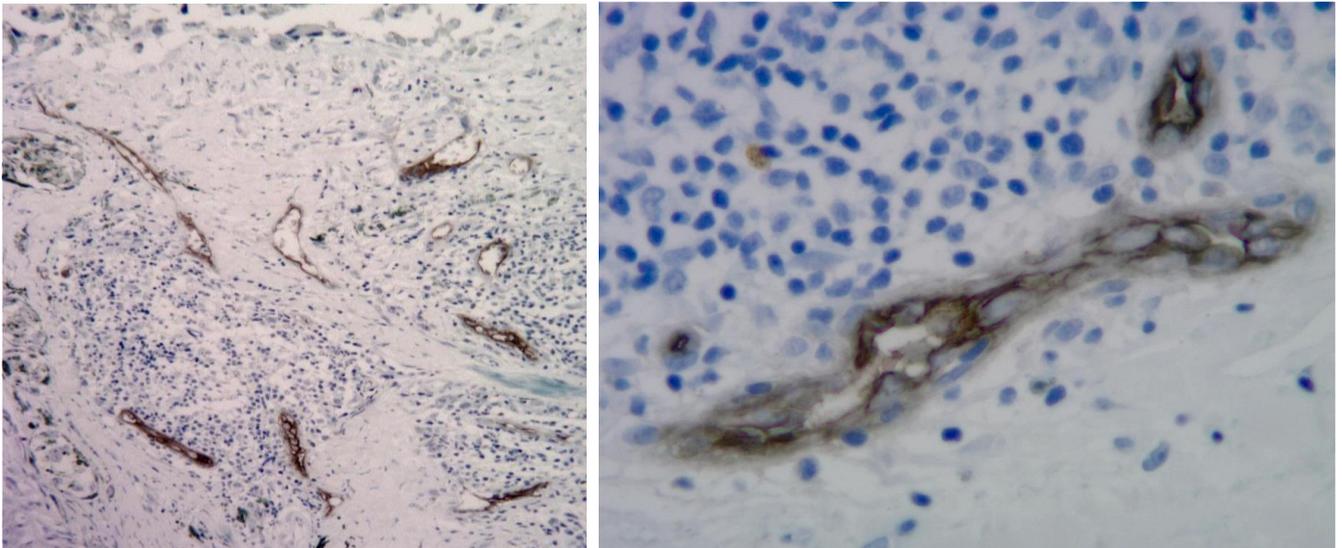


Figura 1. Fotomicrografia da imuno-histoquímica com MECA-79 evidenciando VEAs. A) VEAs em área peritumoral. 40x. B) VEAs em área peritumoral com LITs adjacentes.

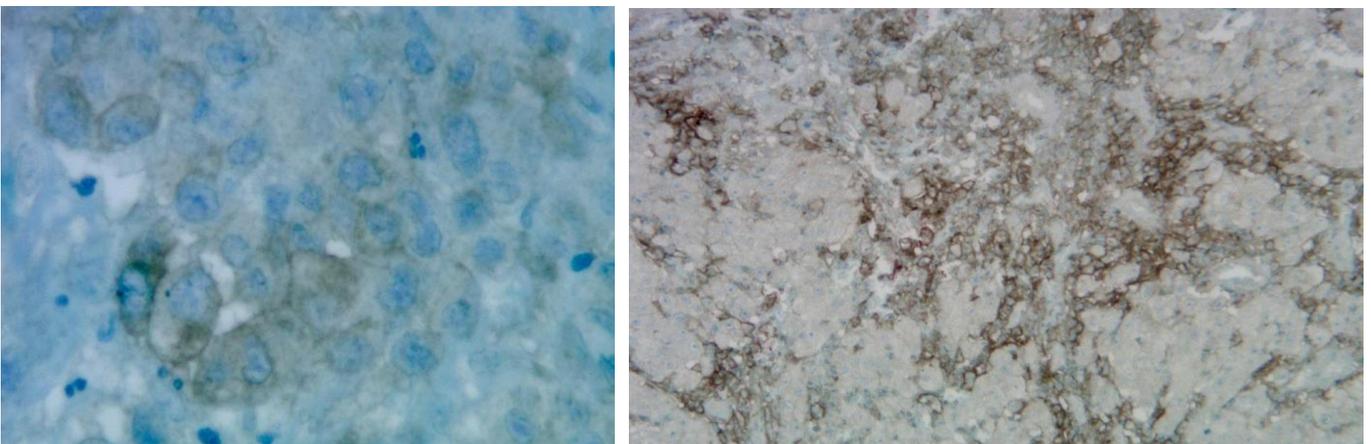


Figura 2. Fotomicrografia da imuno-histoquímica com PD-L1. A) Marcação membranar do PD-L1 (baixa expressão). 400x. B) Marcação membranar do PD-L1 (alta expressão). 100x.

Discussão

Verificou-se maior incidência de melanoma na idade média de 58,1 anos na população estudada, cujas idades variaram entre 36 e 82 anos. Segundo o *National*

Tabela 2. Associação entre o status do LS e os LITs e entre o status do LS e o subtipo histológico em 39 casos

LITs	LS positivo (n=18)	LS negativo (n=21)
Ausente	-	4,7%
Leve	61%	52,3%
Moderado	38,5%	33,3%
Acentuado	-	9,5%
SUBTIPO HISTOLÓGICO		
MES	77,8%	85,7%
MN	16,6%	4,7%
MAL	5,5%	9,5%
LMM	-	-

Tabela 3. Associação entre o status do LS e tipo de tumor, espessura de Breslow, ulceração epidérmica, presença de mitoses, densidade das VEA e PDL1.

Positividade do LS	p	Teste
Tipo de Tumor	0,447	CQP
Espessura de Breslow	0,041	CQP
Ulceração Epidérmica	0,343	CQP
Mitoses	0,025	CQP
VEA	0,645	CQP
PDL1	< 0,001	CQP

DVEAs: Densidade das Vênulas de Endotélio Alto
CQP: teste Chi-quadrado de Pearson.

Tabela 4. Associação entre a espessura de Breslow e a densidade das VEAs, e a expressão de PDL1.

Espessura de Breslow	p	Teste
DVEAs	0,031	CQP
PDL1	0,036	CQP

DVEA: Densidade das Vênulas de Endotélio Alto
CQP: teste Chi-quadrado de Pearson.

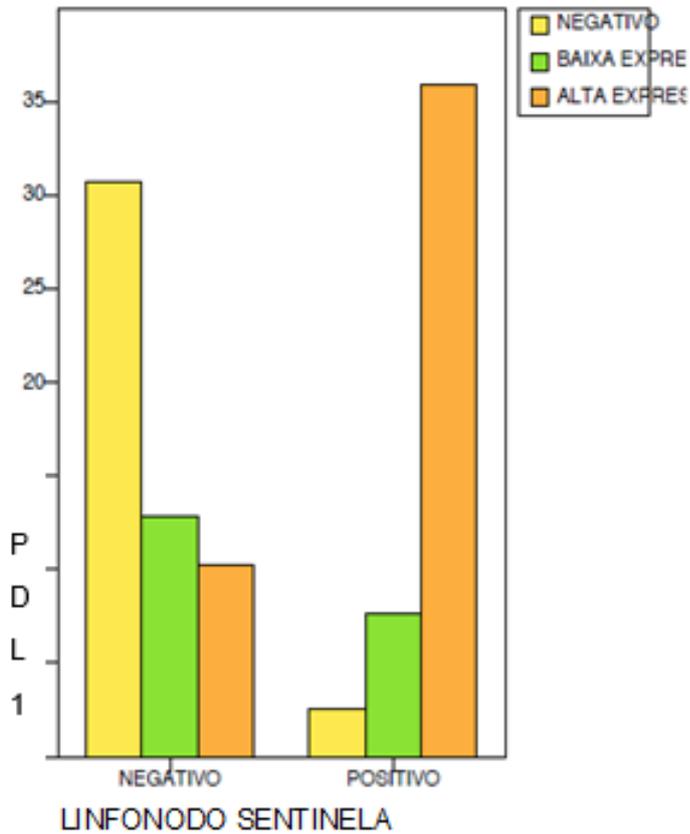
Cancer Institute (NCI), a idade média do diagnóstico, nos Estados Unidos, é de 64 anos, variando entre os 65 e os 74 anos ².

O sexo masculino compôs 53,85% dos casos, enquanto o feminino contribuiu com 46,15%, concordando com o NCI que cita um ligeiro predomínio entre os homens ². Entretanto, há divergência em relação aos estudos de Dimitri (2011) e do INCA (2018), que trazem o sexo feminino como o mais acometido^{31, 32}. O estudo de Naser (2011) também demonstra predomínio de melanoma no sexo feminino, constituindo 56% dos casos ³³.

Acerca do sítio do tumor primário, verificou-se que 51,28% das lesões encontram-se no tronco, 38,46% nos membros e 7,69% na topografia da cabeça e pescoço. Um estudo de coorte canadense, realizada durante 50 anos, apontou o tórax como localização mais frequente do melanoma, principalmente em homens; a localização em membros inferiores foi mais comum nas mulheres. O estudo realizado em Blumenau – SC (2011) demonstrou que 47% da localização primária de melanomas foi no tórax, e destes, 64% foram em homens. Os membros inferiores, a incidência foi de 56,3% para o sexo feminino ³³.

Verificou-se que dos casos onde o linfonodo sentinela foi acometido, 65% apresentaram mitoses. Um estudo realizado por Cherobin et. al (2018), discutiu a associação entre a presença de mitoses e o

Figura 4. Associação entre o status do LS e a expressão de PDL-1



risco aumentado de metástase. Nagore et al, e Karjalainen et al., também detectaram em seus estudos a maior incidência de metástases nos tumores que apresentavam índice mitótico positivo ^{34,35,36}. Postula-se que a presença de mitoses implica em um pior prognóstico de melanoma, porque reflete a natureza proliferativa mais agressiva, gerando clones com maior potencial de metastizar ^{34,35,37}.

A associação entre o acometimento de LS e a intensidade de LITs obteve significância estatística ($p= 0,025$), demonstrando uma associação positiva. A literatura descreve que a presença de LITs representa uma resposta

imunológica ativa contra as células tumorais. Estudos demonstraram um prognóstico favorável associado à presença de LITs em diversos tipos de neoplasias, incluindo melanomas cutâneos ^{7,38,39}.

A associação entre o LS positivo e a intensidade do LITs demonstrou, neste estudo, que em casos de positividade de LS a intensidade de LITs variou de leve (61,11%) a moderada (38,89%). Esses resultados reforçam a ideia de que a intensidade dos LITs pode estar relacionada a uma probabilidade menor de doença metastática ^{7,38,39}.

Nossos resultados mostram que VEA estão presentes em 33 casos (66,6%), e sua presença e densidade podem representar um biomarcador favorável para o prognóstico de melanomas ^{7, 15}. Avram (2013) verificou uma correlação positiva entre a densidade das VEAs e a intensidade de LITs, bem como entre a densidade das VEAs e regressão tumoral. Esses resultados sustentam a ideia de que a presença e densidade das VEAS podem prever a eficiência da resposta do hospedeiro contra as

células tumorais ⁷.

A associação entre a densidade das VEAs e o status positivo de LS, neste estudo, não obteve significância estatística ($p=0,645$), consoante o descrito na literatura^{7,40,41}. Entretanto, supomos que este resultado esteja atrelado ao tamanho da amostra, uma vez que se encontrou associação positiva entre o acometimento de LS e a intensidade dos LITs, e em circunstâncias de uma resposta imune adequada, o tráfego de linfócitos segue para o parênquima linfonodal através das VEAs.

Estudos em microambiente tumoral evidenciam que há mecanismos de escape tumoral do sistema imune, importante característica de alguns tumores, o que pode influenciar na progressão tumoral, chance de metástases em linfonodos regionais e sobrevida. Assim, a expressão de PD-L1 pelas células tumorais e consequente ligação ao seu receptor PD-1 presentes nos linfócitos, leva a inativação destes, reduzindo a chance de resposta imune antitumoral. Pacientes cujo(s) melanoma(s) possuem maior expressão de PD-L1 apresentam sobrevida mais curta e as células que expressam este marcador estão geograficamente localizadas adjacentes aos LITs^{19,21,22,30,42}. Pressupõem-se que terapias direcionadas ao bloqueio do eixo PD-1/PD-L1, poderão ter benefício clínico, por reativar a resposta imune antitumoral, impedindo a progressão tumoral, com menores chances de metástases. Alguns estudos realizados com anticorpos que bloqueiam a interação do PD-1 aos seus ligantes, em melanomas avançados, apresentaram benefício clínico ^{24,26-27,44}.

Observa-se que a maior parte da expressão de PD-L1 ocorreu em melanomas que apresentaram LS positivo, denotando que este marcador tem impacto pior no prognóstico. Melanomas com maior expressão de PD-L1 apresentam grande heterogeneidade e estão em um grupo de doenças com sobrevida mais curta, com maiores chances de recorrência e de metástases^{17,18,22,43}. A literatura relata que as células tumorais que expressam PD-L1 estimulam a apoptose de clones de células T e de células T reativas ao tumor, o que facilita a progressão tumoral, por promover um meio de evasão tumoral do sistema imunológico¹⁸. Massi et.al, afirma em seus estudos, que melanomas que expressam PD-L1 se encontram em um subgrupo com sobrevida global mais curta, com morfologia e características genéticas distintas. Desse modo, o PD-L1 pode ser um marcador prognóstico independente naqueles melanomas que cursam, por suas características morfo-fenotípicas, com maior invasão e agressividade²².

Embora alguns estudos relatem o impacto negativo na sobrevida e progressão

tumoral em melanomas com maior expressão de PD-L1, estes pacientes podem ser candidatos a imunoterapia direcionada ao bloqueio do eixo PD-1/PD-L1, com boas taxas de resposta e com benefício clínico^{15,17,29,30}, o que torna de particular interesse o estudo deste biomarcador de resposta imune tumoral^{42,46}.

Em conclusão, a identificação e quantificação de VEA, a verificação da expressão de PD-L1 e suas associações com o status do linfonodo sentinela, permite maiores informações acerca das características histopatológicas prognósticas em melanomas cutâneos primários. Os resultados obtidos nesse estudo são de interesse, pois poderão contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, o que poderá resultar em aumento da resposta imune antitumoral através da facilitação da migração de LITs através das VEA e da desativação do mecanismo de escape tumoral do sistema imune.

Agradecimentos

Ao Instituto de Patologia de Passo Fundo pela assistência com a seleção das amostras no biobanco e com as técnicas de imuno-histoquímica.

Referências

1. Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC. The melanomas: A synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24(5):879–97.
2. National Cancer Institute. National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975-2012. *SEER Cancer Stat Rev 1975-2012, Natl Cancer Inst.* 2015;(August):1992–2012.
3. Sneyd MJ, Cox B. The control of melanoma in New Zealand. *N Z Med J.* 2006;119(1242).
4. Taylor RC, Patel A, Panageas KS, Busam KJ, Brady MS. Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2007;25(7):869–75.
5. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, Moncrieff M, Murali R, McCarthy SW, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2012;30(21):2678–83.
6. Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer.* 1996;77(7):1303–10.
7. Avram G, Sánchez-Sendra B, Martín JM, Terrádez L, Ramos D, Monteagudo C. The density and type of MECA-79-positive high endothelial venules correlate with lymphocytic infiltration and tumour regression in primary cutaneous melanoma. *Histopathology.* 2013;63(6):852–61.
8. Gallimore A, Godkin A, Ager A. High Endothelial Venues, Help or hindrance in

- the quest for antitumor immunity. *Oncoimmunology*. 2013;2(5):e24272-1-e24272-3.
9. Uchimura K, Rosen SD. Sulfated L-selectin ligands as a therapeutic target in chronic inflammation. *Trends Immunol*. 2006;27(12):559–65.
 10. Drayton DL, Ying X, Lee J, Lesslauer W, Ruddle NH. Ectopic LTO Directs Lymphoid Organ Neogenesis with Concomitant Expression of Peripheral Node Addressin and a HEV-restricted Sulfotransferase. 2003;197(9).
 11. Sinha RK, Yang G, Alexander C, Mage RG. De novo expression of MECA-79 glycoprotein-determinant on developing B lymphocytes in gut-associated lymphoid tissues. *Immunology*. 2006;119(4):461–9.
 12. Miyasaka M, Tanaka T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol*. 2004 May 1;4:360
 13. Michie SA, Streeter PR, Bolt PA, Butcher EC, Picker LJ. The Human Peripheral Lymph Node Vascular Addressin An Inducible Endothelial Antigen Involved in Lymphocyte Homing. 1993;143(6):1688–98.
 14. Middleton J, Americh L, Gayon R, Julien D, Mansat M, Mansat P, et al. A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. *J Pathol*. 2005;206(3):260–8.
 15. Martinet L, Guellec S Le, Filleron T, Lamant L, Meyer N, Rochaix P, et al. Major gateways for tumor-infiltrating lymphocytes High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions. 2012;(September):829–39.
 16. Juneja VR, McGuire KA, Manguso RT, LaFleur MW, Collins N, Haining WN, et al. PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *J Exp Med*. 2017;214(4):895–904.
 17. Muenst S, Schaerli AR, Gao F, D??ster S, Trella E, Droezer RA, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;146(1):15–24.
 18. Xu F, Xu L, Wang Q, An G, Feng G, Liu F. Clinicopathological and prognostic value of programmed death ligand-1 (PD-L1) in renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(9):14595–603.
 19. Y. J, J. Z, X. S, X. Y. Prognostic value of prograded death ligand 1 in patients with solid tumors: A meta-analysis. *J Cancer Res Ther*. 2015;11(5):C38–43.
 20. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*. 2010;116(7):1757–66.
 21. Kashani-Sabet M. Tumor progression by immune evasion in melanoma: Role of the programmed cell death-1/programmed cell death-1 ligand 1 interaction. *Cancer*. 2010;116(7):1623–5.
 22. Massi D, Brusa D, Merelli B, Ciano M, Audrito V, Serra S, et al. PD-L1 marks a subset of melanomas with a shorter overall survival and distinct genetic and morphological characteristics. *Ann Oncol*. 2014;25(September):2433–42.
 23. Leite KR, Reis ST, Junior JP, Zerati M, Gomes Dde O, Camara-Lopes LH, et al. PD-L1 expression in renal cell carcinoma clear cell type is related to unfavorable prognosis. *Diagn Pathol*. 2015;10(1):189.
 24. Sapoznik S, Hammer O, Ortenberg R, Besser MJ, Ben-Moshe T, Schachter J, et al. Novel anti-melanoma immunotherapies: Disarming tumor escape mechanisms. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012.

25. Daud AI, Wolchok JD, Robert C, Hwu WJ, Weber JS, Ribas A, et al. Programmed death-ligand 1 expression and response to the anti-programmed death 1 antibody pembrolizumab in melanoma. *J Clin Oncol*. 2016;34(34):4102–9.
26. Philips GK, Atkins M. Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. *Int Immunol*. 2015;27(1):39–46.
27. Carbognin L, Pilotto S, Milella M, Vaccaro V, Brunelli M. Differential Activity of Nivolumab , Pembrolizumab and MPDL3280A according to the Tumor Expression of Programmed Death-Ligand-1 (PD-L1): Sensitivity Analysis of Trials in Melanoma , Lung and Genitourinary Cancers. 2015;1.
28. Medical C, Accreditation E, Nursing C, Accreditation E. Take free quizzes online at acsjournals.com/ce. 2017
29. Frishberg DP, Balch C, Balzer BL, Crowson a N, Didolkar M, McNiff JM, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with melanoma of the skin. *Cap*. 2009;133(October 2013):1560–7.
30. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res*. 2014;20(19):5064–74.
31. Cardoso DD, Duarte FO, Machado RS, Vieira J, Vasconcellos AC. Melanoma Cutâneo No Brasil Skin Melanoma in Brazil. *Arquivos Catarineses de Medicina* (2009),38.
32. Instituto Nacional do Câncer (INCA/MS). *Estimativas 2018, Disponível:* <http://www2.inca.gov.br>
33. Nasser N. Melanoma Cutâneo – Estudo epidemiológico de 30 anos em cidade do Sul do Brasil, de 1980-2009. *An Bras Dermatol*. 2011;86 (5): 932-41
34. Cherobin, A. C. F. P., Wainstein, A. J. A., Colosimo, E. A., Goulart, E. M. A., Bittencourt, F. V. (2018). Prognostic factors for metastasis in cutaneous melanoma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 93(1), 19–26. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20184779>
35. Nagore E, Oliver V, Botella-Estrada R, Moreno-Picot S, Insa A, Fortea JM. Prognostic factors in localized invasive cutaneous melanoma: high value of mitotic rate, vascular invasion and microscopic satellitosis. *Melanoma Res*. 2005;15:169-77.
36. Karjalainen JM, Eskelinen MJ, Nordling S, Lipponen PK, Alhava EM, Kosma VM. Mitotic rate and S-phase fraction as prognostic factors in stage I cutaneous malignant.
37. Ostmeier H, Fuchs B, Otto F, Mawick R, Lippold A, Krieg V, et al. Can immunohistochemical markers and mitotic rate improve prognostic precision in patients with primary melanoma? *Cancer*. 1999;85:2391-9.
38. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrada S, Collini P, Ca- scinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996; 77; 1303–1310
39. Thorn M, Ponten F, Bergstrom R, Sparen P, Adami HO. Clini- cal and histopathologic predictors of survival in patients with malignant melanoma: a population-based study in Sweden. *J. Natl Cancer Inst*. 1994; 86; 761–769.
40. Gauguier JM, Von Andrian UH. High endothelial venules. *Immunol. Today* 1995; 16; 449–457

41. Girard JP, Moussion C, Förster R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 2012; 12; 762–773.
42. Madore J, Vilain RE, Menzies AM, Kakavand H, Wilmott JS, Hyman J, et al. PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: Implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015;28(3):245–53.
43. Tsai KK, Zarzoso I, Daud AI. PD-1 and PD-L1 antibodies for melanoma. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(11):3111–6.
44. Gadiot J, Hooijkaas AI, Kaiser ADM, Van Tinteren H, Van Boven H, Blank C. Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma. *Cancer.* 2011;117(10):2192–201.
45. Hayasaka H, Taniguchi K, Fukai S, Miyasaka M. Neogenesis and development of the high endothelial venules that mediate lymphocyte trafficking. *Cancer Sci.* 2010;101(11):2302–8.
46. Allen E, Jabouille A, Rivera LB, Lodewijckx I, Missiaen R, Steri V, et al. HHS Public Access. 2017;9(385).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O melanoma é a neoplasia mais fatal dentre os cânceres de pele. Sua gênese está intimamente relacionada à exposição solar, aguda e intermitente. A exposição à radiação ultra-violeta é extremamente mutagênica aos melanócitos, pela desestabilização de proteínas de regulação celular.

O diagnóstico do melanoma é clínico-patológico, e quando estabelecido o diagnóstico tem-se por objetivo o controle local da doença, a fim de evitar disseminação metastática. Os principais tipos histológicos com implicância prognóstica são: o melanoma extensivo superficial (MES), melanoma nodular (MN), melanoma lentigo maligno (melanoma – LMN) e melanoma acral lentiginoso.

O prognóstico do melanoma está associado a achados histopatológicos, que incluem: a espessura de Breslow em milímetros, presença de ulceração epidérmica, presença de mitoses/mm², invasões linfática e vascular, sinais de regressão e presença de linfócitos infiltrantes tumorais (LITs).

Há importância no papel imunogênico do melanoma, principalmente dos parâmetros que avaliam a presença de linfócitos infiltrantes tumorais, os mecanismos de escape tumoral do sistema imune – como a hiperexpressão do ligante 1 de morte celular programada (PDL-1) pelas células tumorais. Vênulas de Endotélio Alto (VEA) são vasos especializados que facilitam a migração de linfócitos ao tumor, reconhecidos pelo marcador MECA-79.

Este estudo avaliou a associação entre a expressão do PD-L1, a densidade de VEAs e o status do linfonodo sentinela do melanoma cutâneo primário – estes, também foram associados aos demais parâmetros clinicopatológicos de importância prognóstica, como idade, sexo, tipo do melanoma, sítio do tumor, espessura de Breslow, presença e grau de LITs, presença de mitoses no componente dérmico e ulceração.

Em relação à análise de sobrevida da amostra – cuja avaliação fazia parte da ideia inicial –, não se pode avaliá-la em razão da falta de dados de seguimento dos pacientes. A análise da sobrevida, portanto, ficaria comprometida pela incerteza dos dados disponíveis, e conseqüentemente, poderia gerar associações errôneas.

O status do linfonodo sentinela mostrou associação positiva com a intensidade dos LITs e a presença de mitoses. Ambos resultados reforçam a ideia de que a

intensidade dos LITs pode estar relacionada a uma probabilidade menor de doença metastática; e a presença de mitoses à um pior prognóstico, pela natureza proliferativa mais agressiva.

Obteve-se uma associação importante entre o status positivo do LS e uma alta expressão de PD-L1, evidenciado que a presença deste marcador implica em um pior prognóstico.

Não houve associação positiva entre o acometimento do linfonodo sentinela e a densidade das VEAs – supomos que em virtude do tamanho da amostra, uma vez que os LITs chegam ao parênquima linfonodal através das VEAs. Encontrou-se uma correlação positiva entre a densidade as VEAs e a intensidade de LITs.

Pressupõem-se que há benefício clínico na implementação de terapias direcionadas ao bloqueio do eixo PD-1/PDL-1, por reativar a resposta imune antitumoral, o que, conseqüentemente, poderá impedir a progressão tumoral e diminuir a probabilidade de doença metastática.

Em conclusão, pode-se obter maiores informações acerca das características histopatológicas prognósticas em melanomas cutâneos primários, através da identificação e quantificação de VEA, da verificação da expressão de PDL-1 e suas associações com o status do LS. Os resultados obtidos poderão contribuir com futuros estudos para o desenvolvimento de novas terapêuticas, o que poderá resultar em aumento da resposta imune antitumoral, pela facilitação da migração de LITs através das VEA e desativação do mecanismo de escape tumoral do sistema imune.

ANEXO A – NORMAS DA REVISTA PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO
AValiação DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS
CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO
SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIDA

1. SUBMISSION

Thank you for your interest in Journal of Cutaneous Pathology. Authors should kindly note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.

Once the submission materials have been prepared in accordance with the Author Guidelines, manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/jcp>.

Data protection

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed.

Preprint policy

This journal will consider for review articles previously available as preprints on non-commercial servers such as ArXiv, bioRxiv, psyArXiv, SocArXiv, engrXiv, etc. Authors may also post the submitted version of a manuscript to non-commercial servers at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

2. AIMS AND SCOPE

Journal of Cutaneous Pathology publishes manuscripts broadly relevant to diseases of the skin and mucosae, with the aims of advancing scientific knowledge regarding dermatopathology and enhancing the communication between clinical practitioners and research scientists. Original scientific manuscripts on diagnostic and experimental cutaneous pathology are especially desirable. Timely, pertinent review articles also will be given high priority. Manuscripts based on light, fluorescence, and electron microscopy, histochemistry, immunology, molecular biology, and genetics, as well as allied sciences, are all welcome, provided their principal focus is on cutaneous pathology. Publication time will be kept as short as possible, ensuring that articles will be quickly available to all interested in this speciality.

3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

i. Original Articles

This format is for publishing original research studies. Papers must be structured under the sub-headings: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, and References.

Word limit: 2,500 words maximum (excluding abstract, references, acknowledgments, tables, and figure legends).

Abstract: 200 words maximum; must be structured under the sub-headings: Background, Methods, Results, and Conclusions.

ii. Brief Communications

This format is for concisely reporting new research findings or novel clinicopathologic observations. Please do not include an epistolary phrase such as "To the editor."

Word limit: 1,000 words maximum.

Abstract: Brief communications should NOT have an abstract.
Figures/Tables: Total of no more than 2 figures and/or tables.
References: Maximum of 10 references.

iii. Case Reports

This format is for publishing single cases or small series having novel scientific content and/or exceptional teaching value. Case reports should be succinct, with a single, focused message, and discuss rare conditions, unique findings, diagnostic challenges, overlapping features, uncommon presentations, or other original observations. Cases that focus on clinical findings, however unusual or striking, are generally not suitable and would be better submitted to a clinically-oriented journal.

Case reports must be structured under the sub-headings: Introduction, Case Report(s), Discussion, Acknowledgments, and References

Word limit: 1,400 words maximum (excluding abstract, references, acknowledgements, tables, and figure legends).

Abstract: 200 words maximum; unstructured (without sub-section headings).

Figures/Tables: Maximum of 6 figures and/or tables.

iv. Cover Quizlets

This format is for publishing intriguing single cases with exceptional teaching value. To invite readers' participation in morphologic diagnosis of "unknown" cases, quizlets are divided into two parts. The preliminary part presents the names of authors and shows all the Figures (without legends), followed by the sentence, "What is your diagnosis?" This is followed by a second, main part that introduces, presents, and discusses the case forming the basis of the quizlet; legends to all figures are presented within the second, main part of the paper. The main text of cover quizlets does not require sub-division under discrete sub-headings, but should follow the general flow: introductory paragraph, report of case, discussion, acknowledgments (if any), and references. Please be careful to number all figure legends according to the appropriate flow of text in the main part of the article. One or more figure will be

selected for publication on the cover of the issue, so long as images are self-explanatory without a legend.

Word limit: 1,400 words maximum (excluding references, acknowledgments, tables, and figure legends).

Abstract: Cover Quizlets should NOT have an abstract.
Figures/Tables: Maximum of 6 figures and/or tables.

v. Perspectives in Dermatopathology

This format is a forum for broad perspectives in cutaneous pathology, including discussion of current controversies, historical insights, and invited commentary on papers published in the same issue of the journal. Perspectives articles may be structured into sub-headings as deemed appropriate, and should follow the general flow: discussion, acknowledgments, and references.

Word limit: 1,400 words maximum (excluding references, acknowledgements, tables, and figure legends).

Abstract: Perspectives in Dermatopathology should NOT have an abstract.

Figures/Tables: Maximum of 6 figures and/or tables.

vi. Reviews

This format is for publishing in-depth reviews and analyses of evolving topics in cutaneous pathology. Papers of the type “Case report and review of the literature” should instead be submitted in the Case Report format. A good review does not merely present the results of a literature search, but rather analyzes evidence-based data and presents a succinct, actionable message to the reader. Content of Review papers are typically similar to that of a lecture presented at a short or long course in a scientific meeting or symposium, and lecturers at such meetings are encouraged to consider transforming a well-received talk into a rigorous, timely paper for dissemination and future citation. Review articles may be structured into sub-headings as deemed appropriate, and should follow the general flow: introduction, discussion, acknowledgments, and references.

Word limit: 2,500 words maximum (excluding references, acknowledgements, tables, and figure legends).

Abstract: Abstracts of Reviews may be structured or unstructured.

Figures/Tables: Maximum of 6 figures and/or tables.

vii. Notes & Comments

Brief remarks commenting on material previously published in the journal will be considered for publication in this section. Please do not include an epistolary phrase such as “To the editor.” In addition to undergoing standard peer review, these papers will be sent for response to the authors of the article being commented upon. Such response may either be published or sent directly to the commentator, at the discretion of the Editor-in-Chief. Notes & Comments should be of compelling general interest to our readers. Please direct any questions or comments directly to the authors regarding such matters as complaints about missed citations, rather than involving the journal as an intermediary.

4. PREPARING THE SUBMISSION

Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: title page; main text file; figures.

Title page

The title page should contain:

- i. Major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's best practice SEO tips);
- ii. A short running title of less than 40 characters;
- iii. The full names of the authors;

iv. The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;

v. Acknowledgments.

Authorship

Please refer to the journal's authorship policy the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on eligibility for author listing.

Acknowledgments

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the section 'Conflict of Interest' in the Editorial Policies and Ethical Considerations section below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Main Text File

The main text file should be presented in the following order:

i. Title, abstract and key words;

ii. Main text;

iii. References;

iv. Tables (each table complete with title and footnotes);

v. Figure legends;

vi. Appendices (if any).

Figures and supporting information should be supplied as separate files.

Abstract

Abstracts and keywords are required for some manuscript types. For details on manuscript types that require abstracts and/or keywords and how to prepare these, please refer to the “Manuscript Types and Criteria” section.

Keywords

Please provide a maximum of 5 keywords, preferably taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at <https://www.nlm.nih.gov/mesh/>.

Main text

As papers are double-blind peer-reviewed, the main text file should not include any information that might identify the authors. For example, do not refer to your institution by name, nor identify your own previous work when citing previously published literature you may have presented or published.

References

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text, citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. For more information about AMA reference style please see the AMA Manual of Style.

Sample references follow:

Journal article

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book

2. Voet D, Voet JG. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p. Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

Internet Document

3. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2003. <http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2003PWSecured.pdf>. Accessed March 3, 2003.

Tables

Tables should be self-contained and should complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive; the table, legend and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figure Legends

All figure legends should begin with the name of the condition or disease being depicted, and should be concise but comprehensive; each figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any special symbols used, and define/explain all abbreviations and unusual units of measurement. Legends to photomicrographs must include the total original magnification for each image; e.g., a photomicrograph originally taken with a 10x ocular lens and a 40x objective lens should be described as having magnification “400x.” Include the stain used for each figure or panel thereof; for routine hematoxylin-eosin stained specimens, abbreviate as (H&E).

Preparing Figures

Composite figures must have a black border clearly separating the individual cells (e.g., a border must clearly separate the elements of a Figure 1A, 1B, 1C, and 1D). Individual cells of composite figures must additionally have a black corner box, with white-font, bolded text identifying the individual cells

(e.g., A, B, C, and D). Clinical photographs must be cropped or otherwise masked so as not to disclose patients' identities.

To clarify figures, authors may include helpful features (arrows, size bars, etc.) in the image. We strongly encourage authors to send us the highest-quality figures possible, from the beginning. TIFF files are the publication-standard format for figures including all photomicrographs. As a less desirable alternative, and for initial peer-review purposes only, we can accept a variety of formats, sizes, and resolutions. However, authors should be aware that submission of poor-quality photomicrographs is one of the main causes for rejection of manuscripts, and submission of suboptimal pictures can only delay publication of an otherwise acceptable paper. Authors are asked to pay particular attention to achieving good white-balancing in photomicrographs. If this proves difficult using a conventional digital camera, authors should consider performing digital scanning of their glass slides in order to achieve excellent, publication-quality photomicrographs.

Color figures: Figures submitted in color may be reproduced in color free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g., graphs and charts) be supplied in black and white so that they will be legible if later printed in black and white.

Data Citation

In recognition of the significance of data as an output of research effort, Wiley has endorsed the FORCE11 Data Citation Principles and is implementing a mandatory data citation policy. Wiley journals require data to be cited in the same way as article, book, and web citations and authors are required to include data citations as part of their reference list.

Data citation is appropriate for data held within institutional, subject focused, or more general data repositories. It is not intended to take the place of community standards such as in-line citation of GenBank accession codes.

When citing or making claims based on data, authors must refer to the data at the relevant place in the manuscript text and in addition provide a formal

citation in the reference list. We recommend the format proposed by the Joint Declaration of Data Citation Principles:

[dataset] Authors; Year; Dataset title; Data repository or archive; Version (if any); Persistent identifier (e.g. DOI)

Appendices

Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text.

Graphical Table of Contents

The journal's table of contents will be presented in graphical form with a brief abstract.

The table of contents entry must include the article title, the authors' names (with the corresponding author indicated by an asterisk), no more than 80 words or 3 sentences of text summarizing the key findings presented in the paper and a figure that best represents the scope of the paper (see the section on abstract writing for more guidance).

Table of contents entries should be submitted to Scholar One in one of the generic file formats and uploaded as "Supplementary material for review" during the initial manuscript submission process.

The image supplied should fit within the dimensions of 50mm x 60mm, and be fully legible at this size.

Supporting Information

Supporting information is information that is not essential to the article, but provides greater depth and background. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

General Style Points

The following links provide general advice on formatting and style.

American usage: Please follow standard USA, not British, conventions with regard to spelling. Thus, for example, write “nevus” not “naevus”; “localize” not “localise”; “tumor” not “tumour.” Before initial submission, authors who are not native-English-speakers are strongly encourage to have their papers rigorously vetted for grammar, spelling, etc. by a qualified colleague, preferably a dermatopathologist. Papers that do not meet basic standards of English usage cannot be accepted.

Abbreviations: In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Initially use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.

Units of measurement: Measurements should be given in SI or SI-derived units. Visit the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) website at <http://www.bipm.fr> for more information about SI units.

Numbers: numbers of ten and under are spelt out, except for: measurements with a unit (8 mmol/l); age (6 weeks old), or lists with other numbers (11 dogs, 9 cats, 4 gerbils). Numbers over 10 are presented as numerals except at the beginning of a sentence. Numbers less than 1 should have a zero placed before the decimal point (e.g., “P< 0.05” not “P<.05”). In accordance with USA practice, please use points, not commas, to denote decimal position (e.g., “0.254” not “0,254”). Please separate the number from the unit by a single space (e.g., “8 mmol/l” not “8mmol/l.”

Trade Names: Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used. Drugs should be referred to by their generic names. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name, and the name and location of the manufacturer, in parentheses.

Wiley Author Resources

Manuscript Preparation Tips: Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available here. In particular, authors may benefit from referring to Wiley's best practice tips on Writing for Search Engine Optimization.

Editing, Translation, and Formatting Support: Wiley Editing Services can greatly improve the chances of a manuscript being accepted. Offering expert help in English language editing, translation, manuscript formatting, and figure preparation, Wiley Editing Services ensures that the manuscript is ready for submission.

5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS

Peer Review and Acceptance

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to our readership. Manuscripts are double-blind peer reviewed. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements.

Data storage and documentation

Journal of Cutaneous Pathology encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper.

Human Studies and Subjects

For manuscripts reporting medical studies that involve human participants, a statement identifying the ethics committee that approved the study and confirmation that the study conforms to recognized standards is required, for example: Declaration of Helsinki; US Federal Policy for the Protection of Human Subjects; or European Medicines Agency Guidelines for

Good Clinical Practice. However, in order to preserve double-blind review, please do not disclose the name of the particular ethics committee within the text of your paper.

Images and information from individual participants will only be published where the authors have obtained the individual's free prior informed consent. Authors do not need to provide a copy of the consent form to the publisher, however in signing the author license to publish authors are required to confirm that consent has been obtained. Wiley has a standard patient consent form available for use.

All studies that make use of any individually-identifiable medical information (including names, dates of birth, pathology accession number, medical record number, etc.) must include a statement regarding formal IRB approval or waiver in the Materials and Methods section.

Note: A simple case report concerning clinical or pathologic findings in a particular patient is not considered to meet accepted criteria for covered research and accordingly does not require IRB approval.

Animal Studies

A statement indicating that the protocol and procedures employed were ethically reviewed and approved, as well as the name of the body giving approval, must be included in the Methods section of the manuscript. Authors are encouraged to adhere to animal research reporting standards, for example the ARRIVE guidelines for reporting study design and statistical analysis; experimental procedures; experimental animals and housing and husbandry. Authors should also state whether experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals:

- US authors should cite compliance with the US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, and Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.
- UK authors should conform to UK legislation under the Animals (Scientific

Procedures) Act 1986 Amendment Regulations (SI 2012/3039).
• European authors outside the UK should conform to Directive 2010/63/EU.

Clinical Trial Registration

The journal requires that clinical trials are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Authors are asked to include the name of the trial register and the clinical trial registration number at the end of the abstract. If the trial is not registered, or was registered retrospectively, the reasons for this should be explained.

Research Reporting Guidelines

Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate it, and use it. Authors are expected to adhere to recognised research reporting standards

Species Names

Upon its first use in the title, abstract, and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species, and authority) in parentheses. For well-known species, however, scientific names may be omitted from article titles. If no common name exists in English, only the scientific name should be used.

Genetic Nomenclature

Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines; see varnomen.hgvs.org, where examples of acceptable nomenclature are provided.

Sequence Data

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL, or GenBank. It is only

necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL, and GenBank on a daily basis.

Conflict of Interest

The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to: patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

Funding

Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <https://www.crossref.org/services/funder-registry/>

Authorship

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how. All those listed as authors should qualify for authorship according to the following criteria:

1. Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
2. Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content;
3. Given final approval of the version to be published. Each author should have

participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content; and
4. Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

Additional Authorship Options. Joint first or senior authorship: In the case of joint first authorship, a footnote should be added to the author listing, e.g. 'X and Y should be considered joint first author' or 'X and Y should be considered joint senior author.'

Publication Ethics

This journal is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read Wiley's Top 10 Publishing Ethics

ORCID

As part of the journal's commitment to supporting authors at every step of the publishing process, the journal requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete.

Publication Ethics

This journal is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts.

6. AUTHOR LICENSING

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or OnlineOpen under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available here. To review the Creative Commons License options offered under OnlineOpen, please click here.)

Self-Archiving definitions and policies. Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions..

7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Accepted article received in production

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with Wiley Author Services. The author will be asked to sign a publication license at this point.

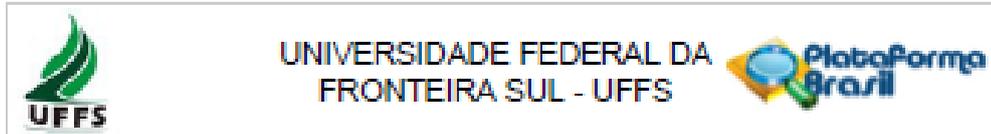
Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted "in press" manuscripts are published online very soon after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only, are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked, and are indexed by PubMed. After publication of the final

version article (the article of record), the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Accepted Articles will be indexed by PubMed; submitting authors should therefore carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so it is correct for indexing. Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO PROJETO
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS
CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO
SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIDA



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIDA

Pesquisador: JOSIANE BORGES STOLFO

Versão: 3

CAAE: 84309618.5.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 017156/2018

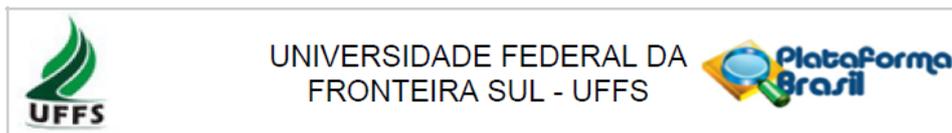
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIDA que tem como pesquisador responsável JOSIANE BORGES STOLFO, foi recebido para análise ética no CEP Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS em 05/03/2018 às 15:07.

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural **CEP:** 89.815-800
UF: SC **Município:** CHAPECO
Telefone: (41)2042-3745 **E-mail:** cep.uffs@uffs.edu.br

ANEXO C – PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIDA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIDA

Pesquisador: JOSIANE BORGES STOLFO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 84309618.5.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.658.074

Apresentação do Projeto:

Já apresentado em parecer anterior.

Objetivo da Pesquisa:

Já apresentado em parecer anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já apresentado em parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora incluiu as modificações relativas às pendências indicadas pelo CEP no documento 'informações básicas do projeto'.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora atendeu todas as pendências indicadas pelo CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há impedimentos éticos ao desenvolvimento do estudo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador(a)

A partir desse momento o CEP passa a ser corresponsável, em termos éticos, do seu projeto de pesquisa – vide artigo X.3.9. da Resolução 466 de 12/12/2012.

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
 Bairro: Área Rural CEP: 89.815-899
 UF: SC Município: CHAPECO
 Telefone: (49)2049-3745 E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



Continuação do Parecer: 2.658.074

Fique atento(a) para as suas obrigações junto a este CEP ao longo da realização da sua pesquisa. Tenha em mente a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, a Norma Operacional CNS 001/2013 e o Capítulo III da Resolução CNS 251/1997. A página do CEP/UFFS apresenta alguns pontos no documento "Deveres do Pesquisador".

Lembre-se que:

1. No prazo máximo de 6 meses, a contar da emissão deste parecer consubstanciado, deverá ser enviado um relatório parcial a este CEP (via NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil) referindo em que fase do projeto a pesquisa se encontra. Veja modelo na página do CEP/UFFS. Um novo relatório parcial deverá ser enviado a cada 6 meses, até que seja enviado o relatório final.
2. Qualquer alteração que ocorra no decorrer da execução do seu projeto e que não tenha sido prevista deve ser imediatamente comunicada ao CEP por meio de EMENDA, na Plataforma Brasil. O não cumprimento desta determinação acarretará na suspensão ética do seu projeto.
3. Ao final da pesquisa deverá ser encaminhado o relatório final por meio de NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil. Deverá ser anexado comprovação de publicização dos resultados. Veja modelo na página do CEP/UFFS.

Em caso de dúvida:

Contate o CEP/UFFS: (49) 2049-3745 (8:00 às 12:00 e 14:00 às 17:00) ou cep.uffs@uffs.edu.br;

Contate a Plataforma Brasil pelo telefone 136, opção 8 e opção 9, solicitando ao atendente suporte Plataforma Brasil das 08h às 20h, de segunda a sexta;

Contate a "central de suporte" da Plataforma Brasil, clicando no ícone no canto superior direito da página eletrônica da Plataforma Brasil. O atendimento é online.

Boa pesquisa!

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1070952.pdf	11/05/2018 11:53:20		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETODEPESQUISAMODIFICADO.pdf	11/05/2018 11:52:39	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
 Bairro: Área Rural CEP: 89.815-899
 UF: SC Município: CHAPECÓ
 Telefone: (49)2049-3745 E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



Continuação do Parecer: 2.658.074

Outros	CARTADEPENDENCIASMODIFICADO.pdf	11/05/2018 11:52:15	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMAMODIFICADO.pdf	20/04/2018 22:31:36	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	24/02/2018 10:41:28	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Outros	PESQUISANAOCIADA.pdf	24/02/2018 10:39:31	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	USODEDADOS.pdf	24/02/2018 10:27:17	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	toledispensa.pdf	24/02/2018 10:25:38	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Orçamento	RECURSOSDETALHADO.pdf	24/02/2018 10:24:55	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biobanco.pdf	24/02/2018 10:23:08	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CHAPECO, 16 de Maio de 2018

Assinado por:

Valéria Silvana Faganello Madureira
(Coordenador)

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
 Bairro: Área Rural CEP: 89.815-899
 UF: SC Município: CHAPECO
 Telefone: (49)2049-3745 E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br

**ANEXO D – TERMO DE CIÊNCIA DO VOLUME FINAL DO TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE CURSO**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E MECA-79 EM MELANOMAS
CUTÂNEOS PRIMÁRIOS: ESTUDO DE ACOMETIMENTO DO LINFONODO
SENTINELA E ANÁLISE DE SOBREVIDA**

TERMO DE CIÊNCIA DO VOLUME FINAL DO TCC

Eu, professora Josiane Borges Stolfo, declaro ter conferido as correções realizadas no artigo científico, conforme sugestão da Comissão Examinadora. Declaro também que estou ciente do conteúdo que compõe o volume final do TCC do Acadêmico Ana Julia Delazeri.

Por ser verdade, firmo o presente documento.

Passo Fundo, _____ de _____ de _____.

Josiane Borges Stolfo