

Aplicação do anticorpo anti WT1 no diagnóstico de lesões melanocíticas

Anti WT1 antibody application's
in the diagnosis of melanocytic diseases

CESAR DE SOUZA BASTOS JUNIOR

Capitão de Corveta (Md) - Encarregado da Seção de Procedimentos Técnicos do Serviço de Patologia do Hospital Naval Marcílio Dias.
Mestre em Medicina pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

JUAN MANUEL PIÑEIRO MACEIRA

Professor Associado do Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
Pós-doutor em Dermatopatologia pelo Armed Forces Institute of Pathology.
Doutor em Medicina pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Resumo: Diversos estudos procuram definir marcadores, para diferenciar lesões melanocíticas benignas e malignas. Em 2006, surgem os primeiros estudos sobre o papel do anti WT1, com resultados contraditórios. **OBJETIVOS:** Descrever padrões de marcação pelo anti WT1, relativos a tamanho, idade, sexo, percentuais de marcação, distribuição e intensidade; verificar a acurácia destas variáveis e o aumento na chance de diagnóstico de melanoma. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram analisadas 249 biópsias cutâneas de lesões melanocíticas, em pacientes de ambos os sexos, além dos dados clínicos, morfológicos e de imuno-histoquímica para anti WT1. **RESULTADOS/DISCUSSÃO:** A maior parte dos melanomas (69,1%) foi encontrada no sexo masculino; 71% das lesões com mais de 75% de células marcadas eram melanomas ($p < 0,001$). A distribuição e intensidade, dérmica e juncional, mostraram pouca diferença no padrão de marcação, principalmente na derme; intervalos de confiança (IC) muito amplos confirmaram a baixa precisão destas variáveis. Apenas percentual acima de 75%, idade e sexo, mostraram maior chance diagnóstica (OddsRatio - OR:3,25; OR:1;07 e OR:2,41; $p=0,003$). A sensibilidade e especificidade para percentual acima de 75% foram 57% (48% – 65%) e 78,1% (70% – 84%) – IC: 95%, respectivamente. A maior parte dos nevos mostrou marcação dérmica (focal ou difusa, forte ou fraca). Os melanomas mostraram maior positividade juncional, semelhante a estudos prévios. **CONCLUSÃO:** Os resultados revelaram acurácia intermediária com a utilização do anti WT1, inferior ao observado com anticorpos tradicionais; acredita-se que a inserção do anti WT1 em um painel conjunto, possa contribuir na decisão diagnóstica.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica. Melanoma. Proteínas WT1.

Como citar este artigo: Bastos Jr CS, Maceira JMP. Aplicação do anticorpo anti WT1 no diagnóstico de lesões melanocíticas. Arq Bras Med Naval. 2017 jan/dez;78(1):28-37.

Submetido: 31 de julho de 2017

Revisado e aceito: 15 de setembro de 2017

Endereço de contato: Rua: César Zama, 185 - Bairro: Lins de Vasconcelos, Rio de Janeiro - RJ, CEP:20725-090

E-mail: hnmd.abmn@marinha.mil.br

Os autores não relatam interesse comercial, financeiro ou de propriedade nos produtos ou empresas descritos neste artigo.
As opiniões expressas neste artigo são de responsabilidade exclusiva dos autores.

Anti WT1 antibody application's
in the diagnosis of melanocytic diseases

INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos, diversos estudos foram realizados com o objetivo de definir marcadores, com capacidade de diferenciação entre lesões melanocíticas benignas e malignas. Com relação aos marcadores imuno-histoquímicos, os anticorpos anti S100, HMB45 e MELAN-A vêm se mostrando como os principais, com sensibilidades e especificidades variadas para cada tipo de lesão. A partir do ano de 2006, começaram a surgir os primeiros trabalhos utilizando o anti WT1, um anticorpo contra o produto de expressão do gene WT1, indutor do Tumor de Wilms, cujos resultados demonstraram a marcação de células de linhagem melanocítica.¹⁻⁴

O estudo de Perry et al.,¹ demonstrou grande expressão imuno-histoquímica para anti WT1 em grupos de células de melanomas em fase de crescimento vertical e, pouca ou nenhuma expressão em células de melanomas em fase de crescimento radial; com uma amostra de 49 melanomas e 27 nevos de diferentes tipos, 89 a 51% dos melanomas e apenas 28,8 a 7,4% dos nevos, apresentaram marcação pelo anti WT1, dependendo do ponto de corte utilizado para diagnóstico (a partir de 10% e 75% de células marcadas, respectivamente). Os valores de especificidade (Es) e valor preditivo positivo (VPP) obtidos, para o diagnóstico de melanoma, foram 70,4% a 92,6% (Es) e 83,7 e 92,6% (VPP), obedecendo aos mesmos pontos de corte. Foi obtida ainda a probabilidade do diagnóstico de melanoma de acordo com os percentuais de marcação pelo anti WT1 (considerando os seguintes percentuais: a partir de 10 e 75%), de 5,9 a 29,7 (**Odds Ratio** ; OR - 95% CI). Dados provenientes de estudos subsequentes²⁻⁵ apontam para a participação do produto do gene WT1 na proliferação celular de melanócitos neoplásicos e que a expressão deste pela técnica da imuno-histoquímica, poderia ser correlacionada a alguns fatores, como a fase de crescimento dos melanomas, subtipos de lesões e o grau de displasia celular da lesão.

Outros marcadores imuno-histoquímicos vêm sendo estudados (HMB45, S100, Melan-A, Tirosinase), mostrando diferentes padrões de marcação das lesões melanocíticas, com acurácia distinta no diagnóstico.⁶⁻⁷ A capacidade da imunomarcação com o anti WT1, de discriminar diferentes lesões melanocíticas e a sua sensibilidade e especificidade, bem como sua capacidade de prever a chance de uma determinada lesão apresentar comportamento de uma lesão maligna, são questões ainda a serem respondidas e que justificam uma investigação sobre a aplicação deste marcador.

OBJETIVOS

Descrever os padrões de marcação pelo anti WT1 em lesões melanocíticas, considerando-se as variáveis: tamanho, idade, sexo, percentuais de marcação celular, distribuição e intensidade da marcação e localização da positividade na célula; verificar a acurácia destas variáveis e o aumento da chance de diagnóstico de melanoma em lesões com imunomarcação positivas para o anti WT1; correlacionar os diferentes padrões de marcação em lesões melanocíticas distintas, com a idade e sexo dos pacientes, localização, cor e tamanho das lesões.

MATERIAL E MÉTODOS

Material: Foi realizado levantamento inicial de lesões melanocíticas analisadas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) entre os anos de 2000 e 2010, com os seguintes critérios de inclusão: realização de biópsia de lesão cutânea primária ou metastática, resultado histopatológico de uma lesão de origem melanocítica, pacientes com idade acima de 18 anos, de ambos os sexos.

Método: Realizado estudo descritivo, transversal e retrospectivo, tendo sido coletados dados a respeito do tipo de lesão melanocítica, o percentual de marcação positiva pelo anti WT1 (dados quantitativos: até 10%, 10 a 50%, 50 a 75% e acima de 75%

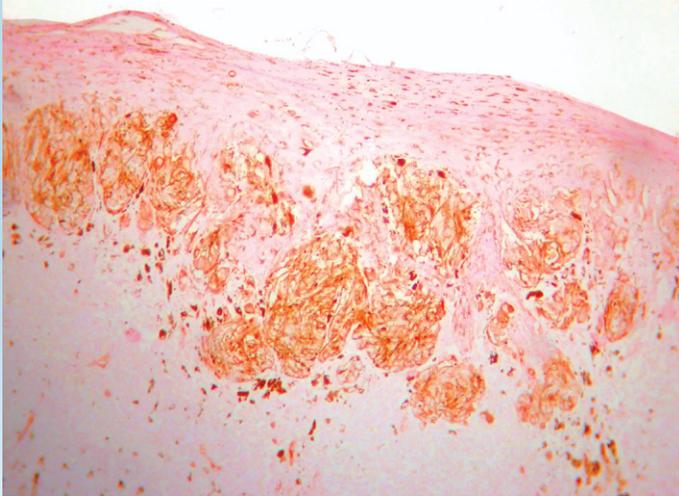
), a intensidade da reação (dados qualitativos: fraco ou forte), além da distribuição da marcação da lesão (focal ou difusa) e do padrão de marcação celular (nuclear, citoplasmático e membrana). Análise microscópica foi realizada em duas etapas: observação da lesão no microscópio em panorâmica (aumento de 40X) para avaliar toda a extensão da lesão, seguida da observação em aumento de 100X, para realizar a contagem do percentual de células marcadas; as lesões onde houve descontinuidade (grupos de células não marcadas) da positividade celular, foram consideradas como focal; caso todas ou quase todas as células fossem marcadas na lesão, considerava-se difusa, como exemplo na figura 1. Para a avaliação da intensidade de marcação considerou-se a concentração do marcador observado à microscopia óptica, independente da distribuição; caso a cor resultante fosse castanho-forte, considerava-se forte; marcações diferentes deste padrão foram consideradas fracas. Para a avaliação dos compartimentos da lesão foram consideradas as localizações juncional, quando as células neoplásicas encontravam-se dispostas ao longo da junção dermo-epidérmica e, dérmicas, quando as células das lesões se localizavam na derme. Foram ainda coletados dados a partir de prontuário eletrônico, para levantamento das idades e sexo dos pacientes, além de localização corporal, tamanho e coloração das lesões.

Técnica imuno-histoquímica: Foi realizado protocolo convencional para imuno-histoquímica, compreendendo as etapas de desparafinação em estufa a 60°, banhos de solução de xilol e lavagem em água destilada, seguida de bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos, recuperação antigênica em panela a vapor a 94° com tampão citrato (pH 6.0 por 20 minutos), seguido de lavagem em água destilada e solução de TBS (pH 7,2) por 5 minutos. Na sequência foi realizado pré-tratamento com solução bloqueadora de proteína por 20 minutos, lavagem em TBS por 5 minutos, seguindo-se incubação com

Anti WT1 antibody application's
in the diagnosis of melanocític diseases**FIGURA 1**

Distribuição difusa da marcação em melanócitos juncionais pelo anti-WT1.

As células neoplásicas do melanoma encontram-se distribuídas na camada basal do epitélio, apresentando coloração castanha intensa, em toda a sua extensão. Pode-se observar ainda depósitos de pigmento de melanina no restante da espessura do epitélio, de coloração variando de marrom a negro.



anticorpo primário anti WT1 humano, clone 6F-H2, previamente diluído (1:100), por 18 horas. Para detecção da reação, foi utilizado sistema de Polímero Novolink® (Leica Microsystems®), conforme recomendações do fabricante. Após a revelação, contrastou-se o material com hematoxilina e, no caso de lesões intensamente pigmentadas, com solução de Giemsa. Por fim, lavaram-se as lâminas em água corrente, procedeu-se a desidratação, clarificação e montagem das mesmas. É importante ressaltar que todas as reações imuno-histoquímicas foram acompanhadas de controles positivos (glomérulo renal) e negativos.

Organização dos Dados e Análise Estatística: Os dados obtidos foram organizados em uma planilha do software Excel®. As variáveis clínicas e histopatológicas consideradas foram as seguintes: sexo, idade, localização corporal, cor e tamanho da lesão, percentual de células marcadas, localização da marcação celular, distribuição e intensidade da marcação na derme e/ou na junção. Foi construído um banco de dados para descrição das variáveis analisadas e, realizados testes estatísticos para inferir a associação entre as variáveis e avaliar os valores de sensibilidade e especificidade, utilizando-se os programas SPSS® (SPSS Inc. Illinois, USA) para Windows,

na versão 10.0.01 e Excel® versão 2010. Para avaliar a associação entre as variáveis categóricas e o diagnóstico de melanoma utilizou-se o teste qui-quadrado. Para a comparação entre as médias de duas populações amostrais utilizou-se o teste "t" de Student. Comparações da frequência de um fenômeno entre grupos de variáveis categorizadas foram realizadas pela aplicação do teste exato de Fisher. Para a verificação de existência de correlação entre duas variáveis com distribuição não-paramétrica, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Utilizou-se análise multivariada por regressão logística, em degraus (stepwise), para a avaliação de correlação entre múltiplas variáveis independentes; valores de p iguais ou menores a 0,05 foram considerados significativos.

Aspectos Éticos: O projeto de dissertação foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho e aprovado sob o número de protocolo 144/11.

RESULTADOS

Foram analisadas 249 biópsias de lesões melanocíticas e subdivididas em dois grupos, sendo 121 casos agrupados como "melanomas" e 128 como "não-melanomas" ou nevos. Os diagnósticos histopatológicos

encontrados encontram-se dispostos na Tabela 1. Com relação à distribuição corporal foram observadas 76 lesões em face, 46 em dorso, 27 em membros superiores, 26 em membros inferiores, 15 em tórax, 10 em região do abdome, 08 em região cervical, 05 no couro cabeludo e 36, em outras localizações. As principais colorações foram: 124 lesões enegrecidas, 86 lesões pardas, 16 acastanhadas, 09 brancas e 14 apresentaram outras descrições de coloração. Com relação à idade, a maior parte dos pacientes encontrava-se na faixa de 66 a 75 anos, sendo que a maioria dos pacientes com melanoma encontrava-se nesta faixa. Com relação ao sexo, dos 121 casos de "melanoma", 65 eram do sexo feminino e 56 do sexo masculino. Já com relação às lesões "não-melanoma", 103 eram do sexo feminino e 25 do sexo masculino. Com relação ao tamanho das lesões, obteve-se: de 0,1 a 0,5 cm (37% dos casos), 0,6 a 1,0 cm (34%), 1,1 a 2,0 cm (20%), 2,1 a 3,0 cm (4%), 3,1 a 4,0 cm (1%) e acima de 4,0 cm (4%). Dados referentes às idades dos pacientes, tamanho e espessura das lesões encontram-se demonstrados na Tabela 2.

A distribuição dos casos de acordo com a positividade para o anti WT1 encontra-se ilustrada na Tabela 3, tendo sido observada localização da positividade do marcador em 100% dos casos, no citoplasma ou na

Anti WT1 antibody application's
in the diagnosis of melanocytic diseases

membrana de células melanocíticas, sem diferença entre nevos ou melanomas. Observou-se, entretanto, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre nevos e melanomas, no que diz respeito a sexo, idade, tamanho da lesão e à positividade para o anti WT1, de acordo com os seguintes parâmetros: percentual de células marcadas, distribuição e intensidade da marcação, conforme pode ser observado na Tabela 4. Após a realização das análises uni e multivariada, por técnica de regressão logística, apenas as variáveis sexo masculino, idade em anos e percentual de células positivas para o anti WT1 acima de 75% mostraram capacidade de predição do diagnóstico de melanoma, de acordo com os valores de **Odds Ratio** (OR), conforme vistos na Tabela 5. Observando os valores de OR e seus intervalos de confiança de 95%, nota-se que a variável "sexo masculino" é fator de risco (OR = 2.42 ; IC95% = 1.20 - 4.85), supostamente aumentando em 2,4 vezes, a chance do diagnóstico de melanoma. Idade também se mostrou como fator de risco e, a cada ano acima de 62,9 anos, aumentou-se a chance, nesta amostra, do diagnóstico de melanoma em 1,07 vezes (OR = 1.07 ; IC95% = 1.05 - 1.09). Por fim, percentual acima de 75% de células marcadas pelo anti WT-1, também se mostrou fator de risco (OR = 3.25 ; IC95% = 1.48 - 7.14), aumentando em cerca de 3,2 vezes, a chance do diagnóstico final ser de melanoma. Por sua vez, apresentar um percentual de células marcadas "de 10 a 50%" sugeriu ser um fator protetor (OR = 0.40 ; IC95% = 0.16 - 1.00), podendo-se inferir, que uma marcação "acima de 10 até 50% das células", esteja mais relacionado ao diagnóstico de uma lesão névica, muito embora o nível de significância para esta variável tenha sido limítrofe ($p = 0,05$).

Para avaliar a capacidade de predição do diagnóstico de melanoma pela marcação das lesões pelo anti WT1, foram calculadas a sensibilidade, especificidade e seus valores preditivos, que demonstraram sensibilidade de 57% (IC95%: 0,48 - 0,65) e especificidade de 78,1% (IC95%: 0,70 - 0,84), considerando-

se como ponto de corte, a marcação acima de 75% das células, conforme a Tabela 6, abaixo.

DISCUSSÃO

Localização da marcação: Na presente casuística, 100% dos casos positivos, demonstraram marcação no citoplasma e na membrana celular. Os trabalhos pesquisados na literatura¹⁻⁵ apontam para a presença de positividade no citoplasma e na membrana celular. Wilsher et al.² descreveram o mesmo padrão, contudo, observando marcação somente na membrana em casos de melanomas *in situ* e nevos displásicos; tal dado não foi confirmado neste estudo.

Distribuição da marcação tecidual: No presente estudo, a maioria dos nevos apresenta positividade focal ou difusa na derme (95,3% dos nevos), enquanto a maior parte dos melanomas (85,9%) apresenta positividade focal ou difusa, no compartimento juncional. Com relação aos nevos, a distribuição dérmica da marcação (focal ou difusa) representou a maioria dos casos, com a seguinte distribuição: 63,4% das lesões com marcação focal e 56,5% das lesões com marcação dérmica difusa, eram lesões do tipo nevo. Já com relação à distribuição da marcação na porção juncional da lesão, apenas 16,7% das lesões névicas apresentavam marcação focal e 18,2%, marcação difusa. Quando comparado aos melanomas, tal diferença se mostrou estatisticamente significativa, com 36,6% das lesões com marcação focal na derme e 43,5%, com marcação difusa na derme ($X^2 = 30,143$; $p < 0,001$). Já quando consideramos a distribuição juncional, o diagnóstico de melanoma é predominante nas categorias focal (83,3%) e difusa (81,3%), sendo a diferença significativa, com relação aos nevos (16,7 - 18,2%, respectivamente - $X^2 = 117,689$; $p < 0,001$). Perry et al.,¹ descreveram grande expressão do anti WT1 em melanomas, sendo observados dois padrões de marcação: homogênea e difusa em células juncionais e intraepidérmicas e, marcação focal, zonal ou ainda de células isoladas, na derme; por sua vez, a maioria dos

nevos não apresentou positividade nos componentes juncional ou dérmico, perfazendo apenas 7,5 a 29,6 % dos nevos da amostra, dependendo dos pontos de corte considerados, tendo sido a observada marcação focal e fraca. Wilsher et al.,² demonstraram também imunonegatividade em nevos, positividade focal e fraca em nevos displásicos e melanomas *in situ* e, positividade na maioria dos nevos de Spitz (83%) e melanomas (88%). Furusato K et al.,³ estudaram 30 lesões melanocíticas de conjuntiva, tendo sido encontrada marcação difusa e intensa pelo anti WT1 em 86% dos melanomas, nenhum deles sendo totalmente negativo para anti WT1. Os autores relataram marcação difusa dos melanomas e, marcação segmentar nos nevos positivamente marcados, com a marcação tornando-se fraca de acordo com a maturação das lesões. Garrido-Ruiz et al.,⁸ apresentaram um estudo com 271 lesões melanocíticas (163 melanomas primários e 108 nevos), utilizando microarranjos teciduais (TMA) onde foi observada maior marcação de anti WT1 em nevos melanocíticos, em comparação com melanomas, diferentemente dos estudos anteriores e do presente trabalho. Esta afirmação, que em uma análise inicial pode parecer dissonante com relação aos estudos anteriormente apresentados (onde o padrão de marcação para nevos era predominantemente focal), pode ser explicada pelas diferenças nos padrões de marcação na junção e na derme; o estudo anterior, de Garrido-Ruiz et al.,⁸ apesar de referir maior positividade em nevos, utiliza análise feita em amostras de microarranjos teciduais (TMA), que apresentam dificuldades de avaliação dos compartimentos dérmico e juncional.

Intensidade da marcação tecidual: A intensidade da marcação juncional foi semelhante aos resultados dos padrões de distribuição, sendo de maior intensidade nos melanomas (85,95 % dos melanomas, contra 16,4% dos nevos) e a diferença estatisticamente significativa ($X^2 = 120,735$; $p < 0,001$). Apenas o estudo de Furusato K e

TABELA - 1

DISTRIBUIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS
IDENTIFICADOS NA POPULAÇÃO ESTUDADA

DIAGNOSTICO	MELANOMA	NÃO-MELANOMA	TOTAL
NEVO COMPOSTO ATÍPICO		2	2
NEVO JUNCIONAL ATÍPICO		3	3
NEVO AZUL		2	2
NEVO COMPOSTO		16	16
NEVO INTRADÉRMICO		93	93
NEVO JUNCIONAL		1	1
NEURONEVUS		2	2
NEVO CONGENITO		2	2
NEVO JUNCIONAL ACRAL		1	1
NEVO LENTIGINOSO		1	1
NEVO DE OTA		1	1
NEVO PENETRANTE		1	1
NEVO DE REED		2	2
NEVO DE SPITZ		1	1
PROLIFERAÇÃO MELANOCÍTICA ATÍPICA	5		5
LENTIGO MALIGNO	6		6
MELANOMA ACRAL	9		9
MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL	1		1
MELANOMA DESMOPLÁSICO	5		5
MELANOMA DISSEMINAÇÃO SUPERFICIAL	35		35
MELANOMA "IN NEVUS"	1		1
MELANOMA METASTÁTICO	5		5
MELANOMA NODULAR	12		12
MELANOMA, "SOE"	15		15
MELANOMA "IN SITU"	27		27
TOTAL	121	128	249

cols,³ dentre os trabalhos analisados, descreve a intensidade de marcação pelo anti WT1, utilizando como padrões negativo e + a +++, porém sem diferenciação entre localização juncional ou dérmica; neste estudo 80% dos nevos apresentaram intensidade de marcação fraca a moderada (+ a ++) e 86% dos melanomas, apresentaram intensidade moderada a forte (++ a +++).

Percentual de células marcadas: Comparando com dados encontrados no presente estudo, foi possível observar que Perry et al.,¹ encontraram distribuição heterogênea da marcação no grupo dos melanomas, com 22,4% dos casos com até 10% das células marcadas, 16,3% entre 10 a 50% e 10,2% e 51,0% nos dois últimos grupos (50 a 75% e acima de 75% de células

marcadas); assim, a maioria dos melanomas (51%) mostrou marcação acima de 75% pelo anti WT1. No estudo de Rosner et al.,⁴ no *cut-off* acima de 10% de células marcadas, foi observado que 89% dos melanomas apresentavam tal padrão; no estudo de Perry et al.,¹ tal limite corresponderia a uma marcação de 77,55% dos melanomas da amostra. No presente estudo, 26,5% dos melanomas marcaram "até 10% das células", semelhante aos 22,45% encontrados em Perry et al.;¹ nas faixas "acima de 10%, até 50%" e "acima de 50% até 75%", encontramos 10,7% e 5,8% dos melanomas respectivamente, enquanto que na faixa percentual "acima de 75%", encontram-se 57% dos melanomas (muito semelhante aos 51% identificados no estudo de Perry et al.¹). Utilizando-se o mesmo parâmetro de

comparação dos estudos de Rosner et al.⁴ e Perry et al.,¹ *cut-off* acima de 10%, corresponderia a um percentual de 73,6% dos melanomas estudados, semelhante aos estudos anteriores.^{1,4} Particularmente, em relação aos melanomas desmoplásicos, Wilsher et al.,² descreveram a marcação positiva e difusa em 11 casos. Um dado interessante verificado neste trabalho foi a falta de marcação em filetes nervosos, ao contrário do que se observa utilizando-se S100, facilitando a avaliação da invasão perineural. Em estudo anterior de nosso grupo,⁹ descrevemos um caso da amostra estudada, com diagnóstico de melanoma desmoplásico que demonstrou marcação positiva para anti WT1 nos componentes juncional e dérmico. Observamos marcação positiva em todos os 05 melanomas

Anti WT1 antibody application's
in the diagnosis of melanocytic diseases

TABELA - 2

**DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM IDADE DOS PACIENTES E
TAMANHO E ESPESSURA DAS LESÕES**

VARIÁVEIS	N VÁLIDOS	N PERDIDOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
IDADE (anos)	249	0	53.16	53.16	53.16	53.16
TAMANHO (cm)	241	8	0.96	0.96	0.96	0.96
ESPESSURA (mm)	73	48	1.26	1.26	1.26	1.26

TABELA - 3

DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE ACORDO COM A POSITIVIDADE PARA O ANTI WT1

VARIÁVEIS		FREQUÊNCIA	PERCENTUAL	PERCENTUAL VÁLIDO
PERCENTUAL DE CÉLULAS MARCADAS	Até 10%	75	30,1	30,1
	Maior 10 a 50%	49	19,7	19,7
	Maior 50 a 75%	28	11,2	11,2
	Acima de 75%	97	39,0	39,0
	Total	249	100,0	100,0
DISTRIBUIÇÃO DÉRMICA	Não Obs.	43	17,3	17,3
	Focal	82	32,9	32,9
	Difusa	124	49,8	49,8
	Total	249	100,0	100,0
DISTRIBUIÇÃO JUNCIONAL	Não Obs.	123	49,4	49,4
	Focal	60	24,1	24,1
	Difusa	66	26,5	26,5
	Total	249	100,0	100,0
INTENSIDADE DÉRMICA	Não Obs.	43	17,3	17,3
	Fraca	71	28,5	28,5
	Forte	135	54,2	54,2
	Total	249	100,0	100,0
INTENSIDADE JUNCIONAL	Não Obs.	123	49,2	49,2
	Fraca	55	22,1	22,1
	Forte	71	28,5	28,5
	Total	249	100,0	100,0

Legenda: Não Obs. – não observada.

desmoplásicos de nossa série, com positividade dérmica, difusa e forte, em 75% dos casos. Não foi observada, marcação em filetes nervosos. Embora a marcação para anti WT1 não represente nenhuma implicação prognóstica adicional, a sua utilização nestes casos pode ser recomendada frente à dificuldade para o diagnóstico deste subtipo de lesão, que não exibe positividade para

marcadores mais específicos para melanoma como o HMB45, bem como o seu emprego permita o diagnóstico diferencial com neoplasias de origem neural.

Probabilidade diagnóstica de acordo com as variáveis estudadas: Um dado observado neste estudo foi que a avaliação do percentual de células marcadas entre nevus e melanomas, não mostrou diferença

significativamente estatística nos *cut-offs* até 10% e de 50 a 75%. A faixa de 10 a 50% mostrou inclusive um efeito protetor discreto, porém com nível de significância limítrofe (OR = 0.40 ; IC95% = 0.16;1.00; p=0,05), o que pode significar que marcação "de 10 a 50% das células", poderia na realidade ser interpretado como um padrão mais característicos das lesões névicas (benignas);

Anti WT1 antibody application's
in the diagnosis of melanocític diseases

TABELA - 4

ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS CATEGÓRICAS E O DIAGNÓSTICO DE MELANOMA

VARIÁVEIS		TIPO DE LESÃO				X ²	p
		Nevo		Melanoma			
		n	%	n	%		
SEXO	Feminino	103	61,3	65	38,7	19,078	< 0,001
	Masculino	25	30,9	56	69,1		
PERCENTUAL DE CÉLULAS MARCADAS	Até 10%	43	57,3	32	42,7	36,571	< 0,001
	de 10 a 50%	36	73,5	13	26,5		
	de 50 a 75%	21	75,0	7	25,0		
	Acima de 75%	28	28,9	69	71,1		
DISTRIBUICAO DÉRMICA	Não Obs.	6	14,0	37	86,0	30,143	< 0,001
	Focal	52	63,4	30	36,6		
	Difusa	70	56,5	54	43,5		
DISTRIBUICAO JUNCIONAL	Não Obs.	106	86,2	17	13,8	117,69	< 0,001
	Focal	10	16,7	50	83,3		
	Difusa	12	18,2	54	81,8		
INTENSIDADE DÉRMICA	Não Obs.	5	11,9	37	88,1	35,539	< 0,001
	Fraca	49	69,0	22	31,0		
	Forte	74	54,4	62	45,6		
INTENSIDADE JUNCIONAL	Não Obs.	107	86,3	17	13,7	120,735	< 0,001
	Fraca	11	20,0	44	80,0		
	Forte	10	14,3	60	85,7		

TABELA - 5

CAPACIDADE DE PREDIÇÃO DAS VARIÁVEIS PARA O DIAGNÓSTICO DE MELANOMA

VARIÁVEIS		Parâmetro	Erro Padrão	Wald	p	OR ajustado	Ic95% para o OR	
							Inferior	Superior
SEXO	Feminino					1,000		
	Masculino	0,882	0,356	6,154	0,013	2,416	1,203	4,850
IDADE	Idade	0,069	,010	45,599	0,000	1,071	1,050	1,093
PERCENTUAL	Até 10%					1,000		
	de 10 a 50%	-0,919	0,468	3,849	0,050	0,399	0,159	0,999
	de 50 a 75%	-0,392	0,574	0,467	0,494	0,676	0,220	2,079
	Acima de 75%	1,180	0,401	8,677	0,003	3,255	1,484	7,139
Constante		-4,235	0,638	44,071	0,000	0,014		

X² (gl) = 109,911 (8) ; p < 0,001. Observação: valores de p muito próximos a zero, com mais de 4 casas decimais, foram arredondados para 0,000.

TABELA - 6

VALORES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE PARA O
DIAGNÓSTICO DE MELANOMAS EM CADA PONTO DE CORTE

CENÁRIOS	PONTOS DE CORTE	SENS (IC 95 %)	ESPEC (IC 95 %)
Cenário 1	acima de 10 %	73,5 (0,65 - 0,80)	33,6 (0,26 - 0,42)
Cenário 2	acima de 50 %	62,8 (0,53 - 0,70)	61,7 (0,53 - 0,69)
Cenário 3	acima de 75 %	57 (0,48 - 0,65)	78,1 (0,70 - 0,84)

Legenda: SENS – Sensibilidade; ESPEC – Especificidade.

TABELA - 7

VARIAÇÕES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE
PARA O ANTI WT1 EM DIFERENTES ESTUDOS

AUTORES	TIPO	MEDIDA	PERCENTUAIS		
			ACIMA 10%	ACIMA 50%	ACIMA 75%
Perry e cols ¹	Melanoma (n=49)	SENS	83,7%	61,2%	51,0%
		ESPEC	70,4%	85,2%	92,6%
Rossner e cols ⁴	Melanoma (n=45)	SENS	89,0%	64,0%	31,0%
		ESPEC	49,0%	77,0%	95,0%
Bastos Jr e cols ⁹	Melanoma (n=121)	SENS	73,5%	62,8%	58,7%
		ESPEC	33,6%	61,7%	78,1%

Legenda: SENS – Sensibilidade; ESPEC – Especificidade.

por tal dado apresentar um nível de significância limítrofe ($p = 0,05$) e não haver demonstrado “qualidades estatísticas” em testes estatísticos posteriores, após os ajustes da regressão logística, este percentual de marcação pelo anti WT1 (10 a 50% das células), não foi considerado como um preditor fidedigno para o diagnóstico de melanomas ou nevos.

Assim, apenas percentual acima de 75% das células mostrou-se como “fator de risco”, aumentando em 3,2 vezes, a probabilidade do diagnóstico de melanoma (OR = 3,255; IC95% = 1.48 – 7,13). Este é um parâmetro de fácil utilização na rotina diária, principalmente por ser um alto percentual, com menor subjetividade na avaliação pela microscopia óptica. Apenas no estudo de Perry et al.,¹ foram calculados valores de razão de chances (OR) para o diagnóstico de melanoma, com base no percentual de células positivas. Nele, em comparação com o percentual de até

10% de células marcadas, a positividade acima de 10% conferiu um risco médio de 5,9 vezes; acima de 25% de células, de 7,1 vezes; acima de 50%, 5,9 vezes e acima de 75% de células, 29,7 vezes.

Idade e Sexo: A idade é um fator de risco descrito na literatura para melanomas, sendo maior entre a 4^a e 7^a décadas de vida.^{1,8} Encontramos nesta casuística uma idade média de 62,9 anos para pacientes com diagnóstico de melanomas, em comparação com a idade média de 43,95 para nevos, e maior chance do diagnóstico de melanomas com o aumento da idade, sendo o risco teoricamente maior a cada ano de vida a partir de 62,9 anos, em aproximadamente 1,07 (OR = 1.07; IC95% = 1.05 – 1.09). Com relação ao sexo, foi observada maior frequência de melanomas na população masculina (apenas 25 dos 128 nevos eram de pacientes masculinos), mostrando, ao final da análise estatística um “risco” de 2,4 maior (OR

= 2.42 ; $p = 0,01$ - IC95% = 1.20 – 4.85) na população masculina, para esta amostra. Trabalhos anteriores não mostram essa tendência, podendo ser uma limitação de nosso trabalho, em virtude da maioria de diagnósticos de melanoma ter sido identificada em homens e, de nevos em mulheres, em nossa casuística.

Acurácia diagnóstica: Perry et al.,¹ à semelhança do que foi realizado em nosso trabalho, utilizou pontos de corte percentuais para cálculo de medidas de acurácia. Quando o ponto de corte estabelecido ficou acima de 10% de células, os valores de sensibilidade (Se) e especificidade (Es) encontrados foram 83,7% e 70,4%; no outro extremo, quando o ponto de corte foi acima de 75%, a sensibilidade caiu para 51,0 % e a especificidade aumenta para 92,6%. Rosner et al.,⁴ encontraram resultados diferentes; considerando-se o **cut-off** acima de 75%, a especificidade encontrada foi de 95%, mas a

Anti WT1 antibody application's
in the diagnosis of melanocític diseases

TABELA - 8

**RESUMO DAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS,
MAIS FREQUENTEMENTE ENCONTRADAS EM NEVOS E MELANOMAS NA AMOSTRA ESTUDADA**

	NEVOS	MELANOMAS	COMENTÁRIO
Localização celular da Marcação	Membrana e citoplasma	Membrana e citoplasma	100 % dos casos
Distribuição da Marcação	Derme (Focal ou Difusa)	Juncional (Difusa)	p<0,001, s/ OR
Intensidade da Marcação	Fraca ou Forte	Fraca ou Forte	p<0,001, s/ OR
Percentual de Células Marcadas	De 10 a 50%	Acima de 75%	p<0,001. OR 3,255
Sexo	H: 38,7% M: 61,3%	H: 69,1% M: 30,9%	p<0,001 OR 2,416
Idade	Média de 43,95 anos	Média 62,9 anos	p<0,001 OR 1,071

Legenda: H - Percentuais de nevos e melanomas em homens. M - Percentuais de nevos e melanomas em mulheres. s/ OR - variáveis cujas diferenças entre nevos e melanomas foram significativas na amostra, porém não tendo demonstrado "maior chance" no diagnóstico de melanomas pelo cálculo do OddsRatio.

sensibilidade caiu para 31%; com limites acima de 10%, a especificidade foi de 49% e a sensibilidade de 89%. No presente estudo, com percentual acima de 10% como limite, a sensibilidade encontrada foi de 73,5% e a especificidade de 33,6%; admitindo-se como ponto de corte, quantidade acima de 75% de células, a sensibilidade encontrada foi de 57% e a especificidade de 78,1%. Um possível motivo para os valores inferiores, pode ser o número de nevos intradérmicos na amostra, apresentando positividade acima de 10% de células marcadas (66,4 %), acima do encontrado em outros estudos,^{1,4} sendo que neste estudo foi observada um padrão de maior marcação dérmica em nevos e marcação juncional em melanomas. O estudo de Perry et al.¹ incluiu em sua amostra apenas 27 nevos, não sendo especificado o seu subtipo, e apresentando uma positividade que variou de 7,4 a 28,8 % dos nevos (de acordo com o *cut off* utilizado). Já no estudo de Rosner et al.,⁴ o percentual de marcação encontrado em nevos, foi de 51 % (em uma amostra de 43 lesões), percentual mais próximo aos dos encontrados no presente estudo. De acordo com estes resultados, podemos inferir que exista uma diferença no percentual de marcação entre nevos e melanomas, muito embora tal diferença tenha mostrado-se significativa apenas utilizando-se o ponto de corte acima de 75%.

A Tabela 7 mostra as variações de sensibilidade e especificidade nestes três estudos, com diferentes limites percentuais. Tanto Perry et al.,¹ quanto Rosner et al.,⁴ não deixam claro se os nevos em seus estudos eram do tipo juncional ou intradérmico e, no último estudo, as análises foram feitas em micro-arranjos teciduais (TMA), o que poderia prejudicar a avaliação da distribuição e do percentual de marcação.

CONCLUSÃO

É possível definir um padrão básico de marcação imuno-histoquímica com o anti WT1, nos 2 principais grupos de lesões melanocíticas: em nevos, mais comumente observou-se marcação dérmica, (focal ou difusa; forte ou fraca), enquanto que em melanomas, a marcação juncional, (difusa, fraca ou forte) foi a mais observada, porém também apresentando marcação dérmica. Todos apresentaram marcação citoplasmática e de membrana. Existe diferença estatisticamente significativa entre nevos e melanomas, considerando todas as variáveis estudadas, sendo que apenas sexo, idade e percentual de células marcadas mostraram contribuição no diagnóstico de melanomas. A tabela 8 resume estas informações. A avaliação por métodos manuais de percentual de células marcadas revelou que a positividade acima de 75%, foi

mais característica de melanomas ($\chi^2 = 36,571$; $p < 0,001$) e representou um aumento na "chance" de diagnóstico de melanomas em 3,25 vezes (OR = 3,25; $p < 0,003$). Os cálculos de medida de sensibilidade e especificidade apresentaram baixa sensibilidade (57%), com especificidade mediana (78,1%), inferiores aos dos marcadores já utilizados nos painéis de rotina (HMB45, Melan-A e S100). Rosner et al.,⁴ mostrou valores muito diferentes de sensibilidade e especificidade, quando comparado a Perry et al.,¹ de acordo com cada ponto de corte percentual de células marcadas, sugerindo que a utilização do anti WT1 como marcador único na diferenciação entre nevos e melanomas, não seja suficiente. Ao término deste trabalho pode-se concordar com esta afirmação, porém acredita-se que a inserção deste marcador em um painel com outros anticorpos mais tradicionais, além da correlação com outros fatores clínicos (sexo e idade), possa contribuir na decisão diagnóstica. Estes achados podem vir a serem ferramentas adicionais na ainda difícil tarefa de diferenciar nevos e melanomas.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Several studies seek to define markers for differentiating benign and malignant melanocytic diseases. In 2006, merge the firsts studies investigating the role of the anti WT1, with contradictory results.

Anti WT1 antibody application's
in the diagnosis of melanocytic diseases

OBJECTIVES: To describe the positivity patterns for anti WT1, related to size, age, sex, positivity percentuals, distribution and intensity; to verify these variables' accuracy to predict melanoma's diagnosis. **MATERIAL AND METHODS:** Were analyzed 249 skin biopsies of melanocytic lesions in patients of both sexes, in addition to clinical data, morphological and immunohistochemical positivity for anti WT1. **RESULTS/DISCUSSION:** Most melanomas (69.1%) was found in males; 71% of lesions with more than 75% of positive cells ($p < 0.001$) were melanomas. The dermal and junctional distribution and intensity, showed little difference, especially in the dermis; very large confidence intervals (CI), confirmed the low precision of these variables. Only positivity above 75% of cells, age and sex, showed greater diagnostic chance (**Odds Ratio**-OR: 3.25; OR: 1; 07 and OR: 2.41; $p = 0.003$). The sensitivity and specificity for more than 75% of cells were 57% (48%-65%) and 78.1% (70%-84%) - IC: 95%, respectively. Most nevi showed dermal positivity (focal or diffuse, strong or weak). The melanomas showed greater junctional positivity, similar to previous studies. **CONCLUSION:** These results showed intermediate accuracy using the anti

WT-1, lower than that observed with traditional antibodies; considering this, the insertion of the anti WT1 in a joint panel, may contribute to the diagnostic decision. **Keywords:** Immunohistochemistry. Melanoma.WT1 proteins.

REFERÊNCIAS

- 1.Perry BN, Cohen C, Govindarajan B, Cotsonis G, Arbiser JL. Wilms tumor 1 expression present in most melanomas but nearly absent in Nevi. Arch Dermatol. 2006;142(8):1031-4.
- 2.Wilsher M, Cheerala B. WT1 as a complementary marker of malignant melanoma: an immunohistochemical study of whole sections. Histopathology. 2007;51(5):605-10.
- 3.Furusato E, Hidayat AA, Man YG, Auerbach A, Furusato B, Rushing EJ. WT1 and Bcl2 expression in melanocytic lesions of the conjunctiva: an immunohistochemical study of 123 cases. Arch Ophthalmol. 2009;127(8):964-9.
- 4.Rosner K, Mehregan DR, Moussai D, Abrams J, Tromp G, Mehregan DA. WT1 marker is not sufficient for distinguishing between melanoma and melanocytic nevi. J Cutan Pathol. 2009;36(10):1077-82.
- 5.Rodeck U, Bossler A, Kari C, Humphreys CW, Györf T, Maurer J, et al. Expression of the WT1 Wilms' tumor gene by normal and malignant human melanocytes. Int J Cancer. 1994 Oct 1; 59(1):78-82.
- 6.Hofbauer GF, Kamarashev J, Geertsen R, Böni R, Dummer R. Melan A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. Melanoma Res. 1998;8(4):337-43.
- 7.Kaufmann O, Koch S, Burghardt J, Audring H, Dietel M. Tyrosinase, Melan-A, and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. Mod Pathol. 1998;11(8):740-6.
- 8.Garrido-Ruiz MC, Rodriguez-Pinilla SM, Pérez-Gómez B, Rodriguez-Peralto JL. WT 1 expression in nevi and melanomas: a marker of melanocytic invasion into the dermis. J Cutan Pathol. 2009;22:17-22.
- 9.Bastos Jr CS, Maceira JMP, Moraes FMB. Desmoplastic melanoma associated with an intraepidermal lentiginous lesion: case report and literature review. An Bras Dermatol. 2013;88(3):247-9.

Uma gota que te falta aqui, chega como alívio para muita gente

Ajude o próximo: **Doe sangue!** Procure as unidades do Saúde Naval e informe-se.

