

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE TROPOMIOSINA QUINASE B E MELANOMA:  
ASSOCIAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS

LUÍS CARLOS MOREIRA ANTUNES

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE TROPOMIOSINA QUINASE B EM MELANOMA:  
ASSOCIAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS

LUÍS CARLOS MOREIRA ANTUNES

Orientador: Prof. Gilberto Schwartzmann

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção de Doutor em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Antunes, Luis Carlos Moreira  
EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE TROPOMIOSINA QUINASE B E  
MELANOMA: ASSOCIAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS / Luis  
Carlos Moreira Antunes. -- 2018.  
78 f.  
Orientador: Gilberto Schwartzmann.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2018.

1. TrkB. 2. TrkA. 3. BDNF. 4. NGF. 5. Melanoma.  
I. Schwartzmann, Gilberto, orient. II. Título.

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.”

Leonardo da Vinci

## **Agradecimentos**

Agradeço ao meu orientador, Professor Gilberto Schwartzmann, pela oportunidade, incentivo, apoio e entusiasmo transmitido.

Ao Professor André Cartell pelo auxílio incansável no laboratório de patologia e na análise dos resultados.

À Dra Caroline Brunetto de Farias e ao Dr Rafael Roesler pelas sugestões e por todo o apoio.

À Professora Francine Hehn de Oliveira, pela ajuda nas fases iniciais do projeto.

À Dra Emily Ferreira Salles Pilar e à bióloga Flavia Rejane Giusti, do Laboratório de Patologia Experimental, pela atenção e dedicação no preparo das lâminas e na realização da técnica de Imuno-Histoquímica.

Ao funcionário Neri Alberto Balen, do Serviço de Patologia do HUSM, pelo auxílio na localização das amostras.

À escriturária Bruna Betat e a enfermeira Sandra Barros, que auxiliaram na localização dos prontuários e registros dos pacientes do HUSM.

Aos colegas, amigos e familiares que compreenderam os meus períodos de ausência.

Ao Professor Rudimar dos Santos Riesgo, pelo exemplo e incentivo com a vida acadêmica.

Em especial às minhas filhas, Maria Antônia, Martina e Natália, e à minha esposa, Cinara, pela compreensão, apoio e carinho durante essa jornada.

## RESUMO

Base teórica: Normalmente, a ativação dos receptores de tropomiosina relacionados à quinase (TRKs) pelas neurotrofinas (NTs) estimulam as vias intracelulares envolvidas na sobrevivência e na proliferação celular. A desregulação da sinalização NT/TRK pode afetar o prognóstico de várias neoplasias. Os dados sobre a expressão de NTs e TRKs no melanoma cutâneo são limitados e não está claro se as vias de sinalização NT/TRK estão envolvidas na origem e progressão dessa neoplasia.

Objetivo: Nós examinamos se a expressão de NT/TRK difere em relação aos estágios e subtipos de melanoma cutâneo, e se está associada com o prognóstico e a sobrevivência dos pacientes com essa neoplasia.

Métodos: Foi realizado um estudo transversal, no qual foi analisado através de imunohistoquímica, as expressões de TrkB e BDNF, além da expressão de outro TRK, o TrkA, e de seu cofetor, o NGF, em 154 amostras de melanoma. Nós investigamos as associações da expressão de NT/TRK com diferentes fatores prognósticos para melanoma, sobrevivência livre de recidiva (SLR) e sobrevivência global (SG). Também foram avaliadas 48 amostras de pele normal e lesões cutâneas pigmentares benignas.

Resultados: Das 154 amostras de melanoma, 81 (58,3%) foram imunopositivas para TrkB, 113 (81,3%) foram imunopositivas para BDNF, 77 (55,4%) foram imunopositivas para TrkA, e 104 (75,4%) foram imunopositivas para NGF. Encontramos forte associação entre a expressão de NT/TRK e vários fatores prognósticos, incluindo estágio TNM ( $p < 0,001$ ), subtipo histológico ( $p < 0,001$ ) e nível de Clark ( $p < 0,05$ ). Também foi encontrada associação entre a imunopositividade das NTs e TRKs, e piores resultados de SG ( $p < 0,05$ , exceto TrkB) e SLR ( $p < 0,05$  em todos).

Conclusão: Nossos resultados mostram uma forte associação entre a expressão de NT/TRK, a progressão do melanoma cutâneo e um pior prognóstico.

Palavras chave: Melanoma, TrkB, NTRK2, Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo, TrkA, NTRK1, NGF

## ABSTRACT

**Background:** Normally, activation of tropomyosin-related kinase (TRK) receptors by neurotrophins (NTs) stimulates intracellular pathways involved in cell survival and proliferation. Dysregulation of NT/TRK signaling may affect neoplasm prognosis. Data on NT and TRK expression in melanomas are limited and it is unclear whether NT-TRK signaling pathways are involved in the origin and progression of this neoplasm.

**Objective:** We examined whether NT/TRK expression differs across different cutaneous melanoma grades and subtypes and whether it is associated with melanoma prognosis and survival.

**Methods:** A cross-sectional study was performed in which the expression of TrkA, TrkB, nerve growth factor (NGF), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were analyzed by immunohistochemistry (IHC) of 154 melanoma samples. We investigated NT/TRK expression associations with prognostic factors for melanoma, relapse-free survival (RFS), and overall survival (OS). We also evaluated 48 samples of normal skin or benign pigment cell lesions.

**Results:** Of the 154 melanoma samples, 81 (58.3%) were TrkB immunopositive, 113 (81.3%) were BDNF immunopositive, 77 (55.4%) were TrkA immunopositive, and 104 (75.4%) were NGF immunopositive. We found NT/TRK expression associated strongly with several clinical prognostic factors, including tumor-node-metastasis (TNM) stage ( $p < 0.001$ ), histological subtype ( $p < 0.001$ ), and Clark level ( $p < 0.05$ ), as well as with a worse OS ( $p < 0.05$  for all, except TrkB) and RFS ( $p < 0.05$  for all).

**Conclusion:** Our results show strong associations of NT/TRK expression with melanoma stage progression and a poor prognosis.

**Key words:** Melanoma, TrkB, NTRK2, Brain-Derived Neurotrophic Factor, TrkA, NTRK1, NGF

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estratégia para busca de referências bibliográficas.....	14
Figura 2.	Marco conceitual.....	15
Figura 3.	Relação embriológica entre melanócitos e as mais comuns populações de células neuronais.....	16
Figura 4.	Representação espacial da incidência mundial de melanoma cutâneo em 2018, para ambos os sexos e todas as idades.....	17
Figura 5.	Representação espacial das taxas brutas de incidência de melanoma por 100 mil homens, estimada para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação.....	17
Figura 6.	Representação espacial das taxas brutas de incidência de melanoma por 100 mil mulheres, estimada para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação.....	18
Figura 7.	Eventos biológicos e alterações moleculares na progressão do melanoma.....	20
Figura 8.	Resumo das principais vias de sinalização molecular relacionadas com a carcinogênese do melanoma.....	28
Figura 9.	Resumo das interações imunológicas no microambiente do melanoma.....	29
Figura 10.	Expressão de TrkB em amostras de diferentes tecidos humanos.....	30
Figura 11.	Expressão de BDNF em amostras de diferentes tecidos humanos.....	31
Figura 12.	Representação dos receptores TRK e principais vias de transdução de sinal...	34



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Definição de tumor primário – TNM.....	22
Tabela 2. Definição de linfonodo regional – TNM.....	22
Tabela 3. Definição de metástase à distância – TNM.....	23
Tabela 4. Grupos de estágios anatômicos para o melanoma cutâneo – TNM.....	24
Tabela 5. Níveis de invasão de Clark.....	24
Tabela 6. Índice de espessura de Breslow.....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AJCC: American Joint Committee
- ASCO: American Society of Clinical Oncology
- BDNF: Brain-derived neurotrophic factor (Fator neurotrófico derivado do cérebro)
- BRAF: B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
- CDKN2: Ciclin-dependent kinase inhibitor 2A
- c-Kit: v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene
- CTLA4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
- ERK: Extracellular signal-regulated kinases (Quinase reguladora de sinal extracelular)
- ESMO: European Society for Medical Oncology
- GLOBOCAN: Registro de incidência, mortalidade e prevalência do câncer no mundo (IARC)
- GNAQ: Guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide
- IARC: Internacional Agency for Research on Cancer
- INCA: Instituto Nacional do Câncer
- MAPK: Mitogen-activated protein kinase 1 (Proteína quinase 1 ativada por mitógeno)
- MEK: MEK2 protein kinase
- MITF: Microphthalmia-associated transcription factor
- NGF: Neural growth factor (Fator de crescimento neural)
- NRAS: Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
- NT-3: Neurotrofina 3
- NT-4/5: Neurotrofina 4/5
- P75: Low-affinity nerve growth factor receptor (receptor de neurotrofinas, de baixa afinidade)
- PD-1: *programmed cell death-1*
- PI3K: Phosphoinositide 3-kinases (Fosfatidilinositol 3 quinase)
- PKC: Protein Kinase C (Proteína quinase C)
- PTEN: Phosphatase and tensin homolog
- RAS: Retrovirus-associated DNA sequences
- RTK: Receptor Tyrosine Kinases (Receptores de tirosina-quinase)
- TRK: Tropomyosin-related kinase (Receptor de Tropomiosinaquinase)
- TrkA, NTRK1: Tropomyosin-related kinase A (Tropomiosinaquinase A, receptor para NGF)
- TrkB, NTRK2: Tropomyosin-related kinase B, (Tropomiosinaquinase B, receptor para BDNF)
- TrkC, NTRK3: Tropomyosin-related kinase C, (Tropomiosinaquinase C, receptor para Neurotrofina 3)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
<b>2.1</b>	<b>Estratégias para Localizar e Selecionar as Informações</b> .....	13
<b>2.2</b>	<b>Melanoma</b> .....	15
2.2.1	Epidemiologia do Melanoma.....	16
2.2.2	Fatores de Risco e Predisposição Genética.....	18
2.2.3	Fatores Patológicos.....	19
2.2.4	Diagnóstico e Fatores Prognósticos.....	20
2.2.5	Tratamento.....	26
<b>2.3</b>	<b>Receptores de Tropomiosina Relacionados à Quinase e Neurotrofinas</b> .....	29
<b>2.4</b>	<b>Receptores de Tropomiosina Relacionados à Quinase e o Melanoma</b> .....	31
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	35
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
<b>4.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	36
<b>4.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	36
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
<b>5.1</b>	<b>Delineamento</b> .....	37
<b>5.2</b>	<b>Caracterização de Amostra</b> .....	37
<b>5.3</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	39
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....	41
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	42
<b>8</b>	<b>ARTIGO</b> .....	53
<b>9</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	77
<b>10</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	78

## 1 INTRODUÇÃO

O melanoma tem apresentado, nas últimas décadas, um aumento nas taxas de incidência no Brasil e no mundo.<sup>1-4</sup> Esse tumor apresenta elevada capacidade de gerar metástases, resultando em elevadas taxas de mortalidade.<sup>3</sup> A cor da pele e a exposição aos raios ultravioleta são os principais fatores de risco, tornando essa neoplasia um ótimo modelo de estudo do papel da interação entre fatores genéticos e o meio ambiente na gênese de um tumor.<sup>5,6</sup>

O sucesso do tratamento em estágios iniciais é dependente da ressecção cirúrgica da lesão, onde mesmo respeitando-se os princípios da cirurgia oncológica, a ocorrência de metástases não é infrequente.<sup>7</sup> Quando em estágios avançados, a sobrevida global é extremamente baixa. Até recentemente a resposta à quimioterapia citotóxica, à imunoterapia com interferon e interleucina, ou à combinação dessas, era considerada pobre.<sup>8</sup> Os avanços na elucidação dos mecanismos celulares e imunológicos envolvidos na origem e na progressão do melanoma, permitiram o desenvolvimento de novas terapias com melhores resultados.<sup>9</sup> Entretanto, as novas terapias também apresentam limitações quanto às taxas de resposta, ao controle da doença, à toxicidade e ao elevado custo.

Essas limitações tornam claro que muito ainda há para se aprender quanto à biologia do melanoma. A identificação de novos alvos nas vias de sinalização, que possam ser inibidas por terapias dirigidas contra alvos moleculares específicos, pode ser o primeiro passo para o aperfeiçoamento de terapias com potencial maior eficácia e menor toxicidade. Um possível mecanismo para o desenvolvimento de metástases, seria a desorganização da membrana basal do endotélio vascular, permitindo a penetração das células neoplásicas, a sua disseminação e consequente colonização de órgãos distantes. As células que dão origem ao melanoma, os melanócitos, parecem responder ao estímulo de neurotrofinas, aumentando a produção de enzimas que provocariam a degradação da membrana basal.<sup>10</sup> Vários estudos com outras neoplasias sugerem que a expressão aumentada de uma neurotrofina chamada de Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) e de seu receptor, o receptor de tropomiosina relacionado à quinase B (TrkB), promovem o crescimento, a invasão e a capacidade de metastizar, além de promover resistência a quimioterapia.<sup>11</sup>

Este estudo analisou a expressão do receptor TrkB, e de seu co-efetor, o BDNF, em amostras de melanoma; e se existe associação com fatores prognósticos, como os níveis de espessura de Breslow e de invasão de Clark, entre outros. Além dessas possíveis associações, foram avaliadas a sobrevida livre de recidiva (SLR) e a sobrevida global (SG) desses pacientes. Também foi avaliado outro receptor de tropomiosina quinase, o TrkA, e o seu cofetor, o NGF.

Para isso foi realizado um estudo transversal, onde o fator de estudo foi o diagnóstico histológico de melanoma, e o desfecho, o perfil de expressão de TrkA, TrkB, NGF e BDNF.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estratégias para Localizar e Selecionar as Informações

Esta revisão da literatura (Figura 1) está focada na investigação da expressão da TrkB no melanoma e de um possível papel desses receptores no prognóstico do melanoma (Figura 2). A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed, LILACS, Embase e banco de teses da CAPES. Foram realizadas buscas através dos termos “Melanoma”, “Cancer”, “TrkB”, “NTRK2”, “TrkA”, “NTRK1”, “BDNF” e “NGF”, e suas combinações. Após a busca, os artigos foram selecionados pelos critérios de relevância e atualidade.

Quando a busca foi realizada pelo PubMed, foi utilizado o filtro “title/abstract” para os descritores “Melanoma”, “TrkB”, “NTRK2”, “BDNF”, “TrkA”, “NTRK1” e “NGF”. Quando esses foram avaliados em conjunto, foram usados os filtros “title/abstract” para os descritores “Melanoma” e “Cancer”; e o filtro “all fields” para “TrkB”, “NTRK2”, “BDNF”, “TrkA”, “NTRK1” e “NGF”.

Quando a base de dados foi o LILACS, para os descritores “Melanoma”, “TrkB”, “NTRK2”, “BDNF”, “TrkA”, “NTRK1” e “NGF”, foi utilizado o filtro “título”. Quando avaliado o descritor “Melanoma” em conjunto com “TrkB ou NTRK2”, “BDNF”, “TrkA ou NTRK1” e “NGF”, os filtros utilizados foram “ título, resumo, assunto”. E quando estes descritores foram avaliados em conjunto com “cancer”, foram utilizados os filtros, “título” para “cancer” e “ título, resumo, assunto” para “TrkB ou NTRK2”, “BDNF”, “TrkA ou NTRK1” e “NGF”.

Quando utilizado o Embase, foi utilizado o filtro “title” para pesquisar os descritores “Melanoma”, “TrkB”, “NTRK2”, “BDNF”, “TrkA”, “NTRK1” e “NGF”; assim como para a combinação desses com “cancer”. Quando “TrkB”, “NTRK2”, “BDNF”, “TrkA”, “NTRK1” e “NGF” foram avaliados em conjunto o descritor “Melanoma”, o filtro “title and abstract” foi usado para os primeiros e o filtro “title” para “Melanoma”.

No Portal de Periódicos Capes, foi realizada a busca de artigos com os descritores “Melanoma”, “TrkB”, “NTRK2”, “BDNF”, “TrkA”, “NTRK1” e “NGF”, com filtro “título”. Enquanto que, para as combinações, foi utilizado o filtro “no título” para “Melanoma” ou “cancer”; e o filtro “qualquer” para “TrkB”, “NTRK2”, “BDNF”, “TrkA”, “NTRK1” e “NGF”. Nesta ferramenta de busca, os descritores sinônimos TrkB e NTRK2, assim como TrkA e NTRK1, foram combinados isoladamente com “Melanoma” e com “cancer”. Foram também

consultados livros-texto, trabalhos apresentados nos congressos da ASCO e da ESMO, os dados de incidência de câncer da GLOBOCAN/IARC e do INCA, além do PUBMED Gene.

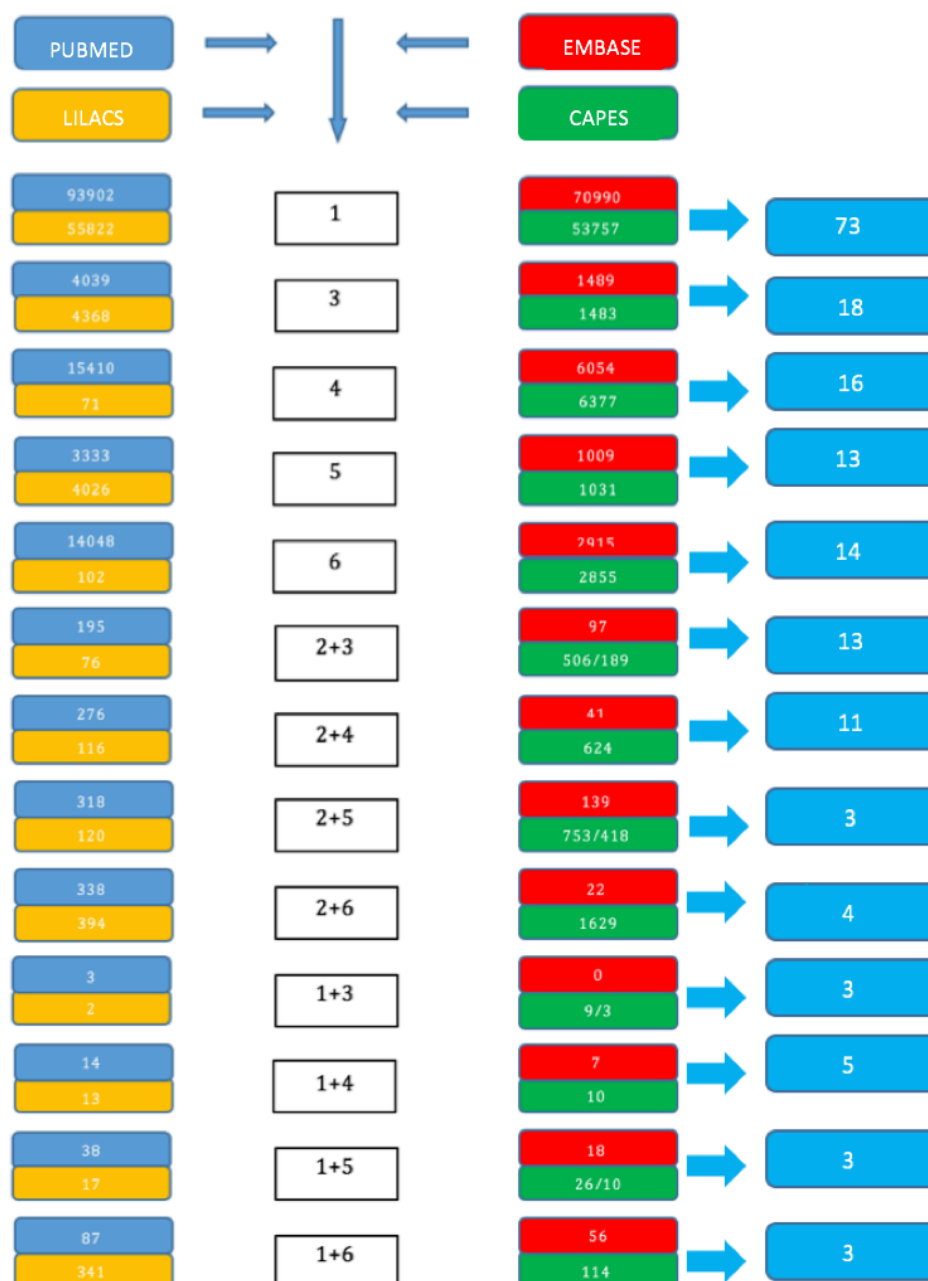


Figura 1. Estratégia para busca de referências bibliográficas

Palavras-chave: 1, Melanoma; 2, cancer; 3, TrkB ou NTRK2; 4, BDNF; 5, TrkA ou NTRK1; 6, NGF

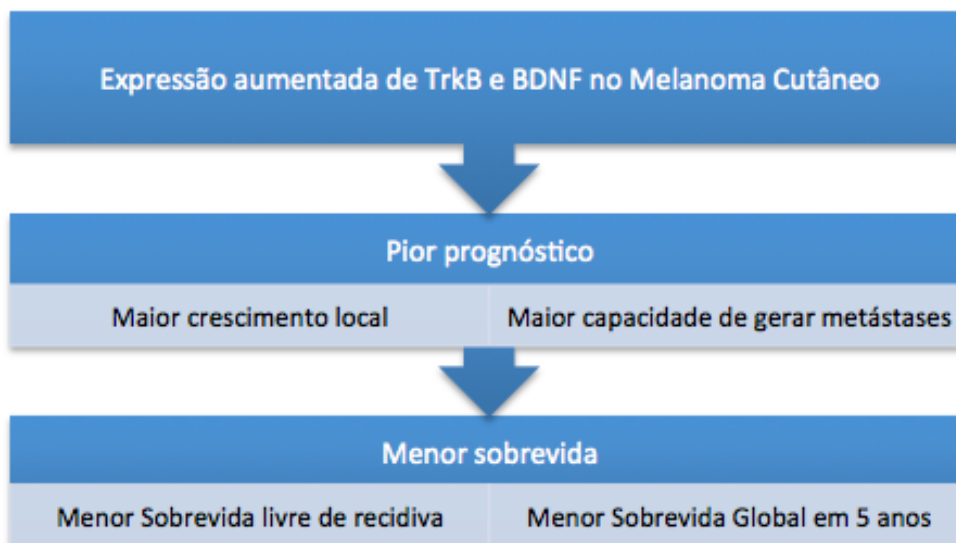


Figura 2. Marco conceitual: Como já demonstrado na literatura com relação aos receptores de TRK e NTs, em várias neoplasias, a nossa hipótese é de que a expressão alterada de TrkB e BDNF ocorre no melanoma cutâneo, resultando em pior prognóstico e menor sobrevida.

## 2.2 Melanoma

Originalmente descrito por René Laennec em 1812, o melanoma é uma neoplasia maligna da pele com elevado potencial de invasão e formação de metástases.<sup>12</sup> Embora represente apenas 4% dos cânceres dermatológicos, ele é responsável por 80% das mortes por câncer de pele.<sup>5</sup>

O melanoma possui origem neuroectodérmica (Figura 3), a partir dos melanócitos que migram da crista neural para toda epiderme, durante a embriogênese.<sup>10, 13</sup> Além da membrana basal da epiderme, os melanócitos também são encontrados no infundíbulo e na região bulbar dos folículos pilosos, na coróide e na leptomeninge.<sup>14</sup> O grau de diferenciação dos melanócitos pode ser avaliado pela capacidade de síntese da melanina, que depende da atividade de enzimas como as tirosinases, as quais são expressas preferencialmente por melanócitos e eventualmente por melanomas.<sup>15</sup>



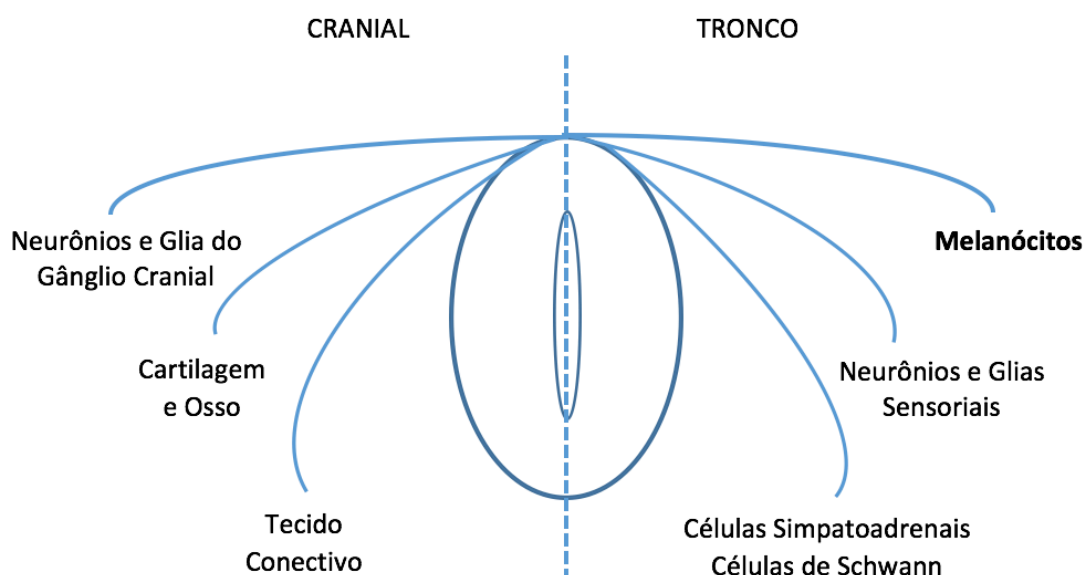


Figura 3. Relação embriológica entre melanócitos e as mais comuns populações de células neuronais, ambas derivadas da crista neural.

Fonte: adaptado de Denkins Y et al. Brain metastases in melanoma: Roles of neurotrophins. *Neuro-Oncology* 6, p155, 2004.

### 2.2.1 Epidemiologia do Melanoma

A estimativa nos EUA para o ano de 2018, segundo a American Cancer Society, foi de 55.150 novos casos de melanoma em homens e 36.120 em mulheres, com um total de 9.320 óbitos em ambos os sexos.<sup>3</sup> Ocorrendo um aumento nas taxas de incidência de 1,8% no sexo masculino e 2,3% no sexo feminino, no período de 2010 a 2014.<sup>3</sup> As maiores incidências do mundo (Figura 4) ocorrem na Oceania, com o melanoma ocupando a quarta posição entre as neoplasias malignas na Austrália.<sup>16</sup> No Brasil, a estimativa de 2018 foi de 2.920 casos novos em homens e 3.340 em mulheres, com taxas estimadas para o Rio Grande do Sul de 8,02/100.000 habitantes para o sexo masculino (Figura 5) e 7,09/100.000 para o sexo feminino (Figura 6).<sup>2</sup>

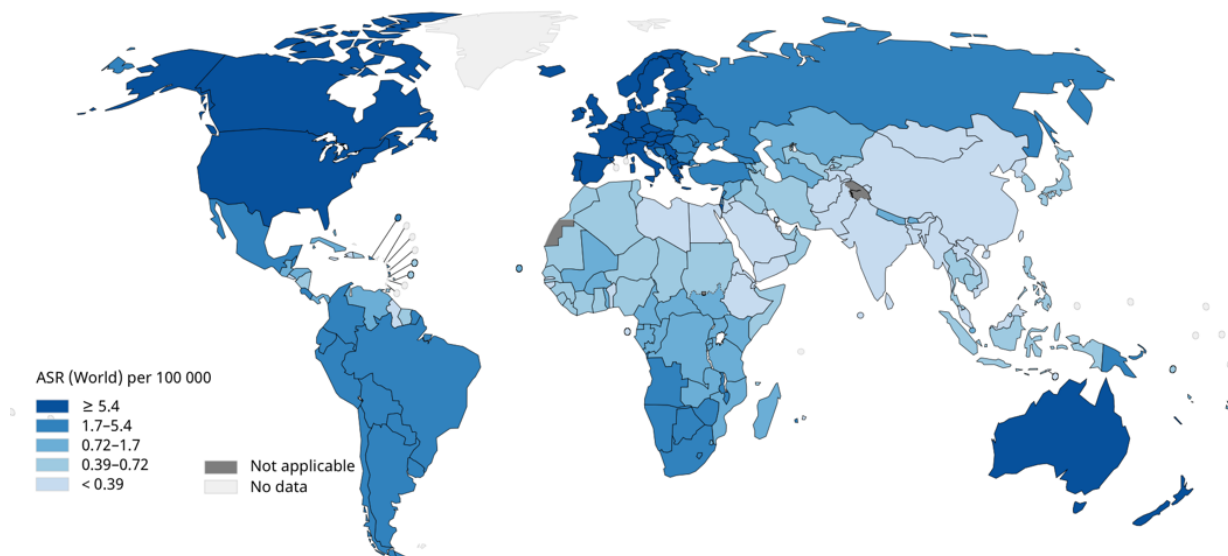


Figura 4. Representação espacial da incidência mundial de melanoma cutâneo em 2018, para ambos os sexos e todas as idades

Fonte: International Agency for Research on Cancer – IARC.

Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx>

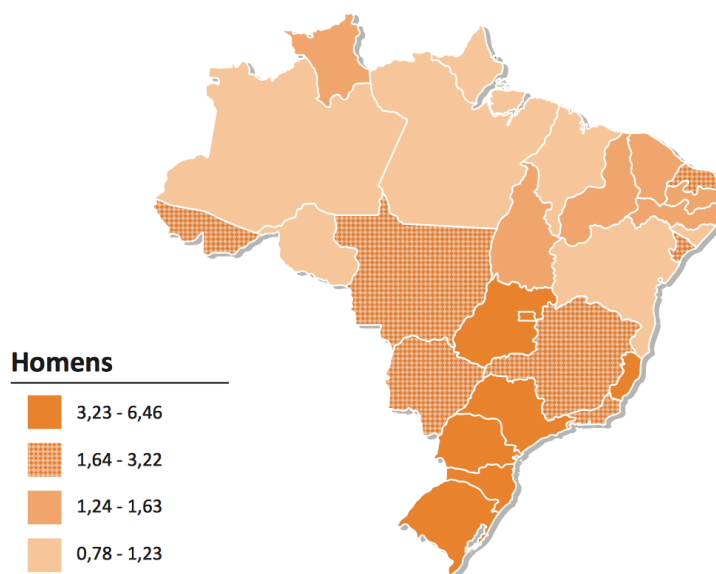


Figura 5. Representação espacial das taxas brutas de incidência de melanoma por 100 mil homens, estimada para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação

Fonte: Instituto Nacional do Câncer – INCA.

Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>

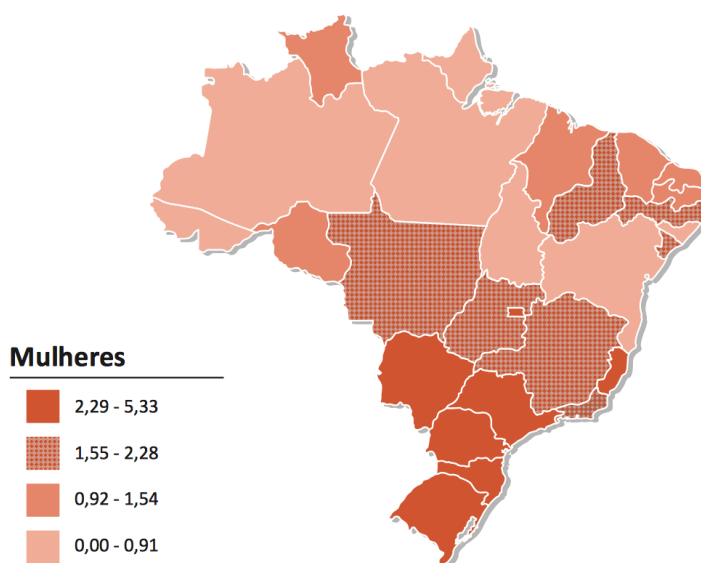


Figura 6. Representação espacial das taxas brutas de incidência de melanoma por 100 mil mulheres, estimada para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação

Fonte: Instituto Nacional do Câncer – INCA.

Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>

### 2.2.2 Fatores de Risco e Predisposição Genética

Com uma frequência muito maior em caucasianos do que em negros, os principais fatores de risco para o melanoma são: história familiar, múltiplos nevos benignos ou atípicos, melanoma prévio, imunossupressão, sensibilidade ao sol, exposição à radiação ultravioleta (UV), características fenotípicas incluindo cabelos, olhos e pele claras, e predisposição ao surgimento de sardas.<sup>5, 17</sup> O efeito da exposição à luz UV é resultante de variações em genes específicos (polimorfismos) que afetam a resposta defensiva da pele à luz UV e, consequentemente, aumentam o risco de melanoma.<sup>5</sup> Há um dano na função imunológica cutânea, um aumento da produção local de fatores de crescimento e a indução da formação de espécies reativas de oxigênio que danificam o DNA.<sup>5</sup>

Foram identificadas alterações genéticas presentes tanto em nevos benignos quanto em melanomas, sugerindo um papel nos estágios iniciais do desenvolvimento do melanoma.<sup>5, 18</sup> Entre essas alterações, podemos citar as mutações dos genes BRAF, NRAS, c-KIT, GNAQ, PTEN e MITF.<sup>19-31</sup>

Em 25 a 40% dos casos de melanoma familiar, o qual representa 10% dos melanomas, o locus CDKN2A é perdido por deleção de uma porção do cromossomo 9.<sup>32</sup> Esse locus codifica proteínas que atuam como supressores tumorais, como a p16 (INK4A) e a p19.<sup>32</sup> Mutações germinativas em CDKN2A podem ser detectadas em 5% a 72% dos casos, dependendo do critério de seleção usado para a pesquisa e da região geográfica.<sup>33</sup> Na América Latina, a

mutação no CDKN2A apresenta uma frequência de 24% nas famílias com predisposição ao melanoma.<sup>34</sup> E no Sul do Brasil, a variante CDKN2Ap.A148T foi identificada como um alelo de suscetibilidade, principalmente em descendentes de europeus.<sup>35</sup>

Nos casos de melanoma não-familiar, ou esporádico, a mutação do gene BRAF está presente em torno de 50% dos casos de melanoma cutâneo, principalmente em áreas de pele sem dano solar crônico.<sup>21, 36</sup> Entre 15% a 25% dos casos de melanoma cutâneo ocorre mutação do NRAS, principalmente em áreas de pele foto-expostas.<sup>21, 37</sup> Essas mutações, nos genes BRAF e NRAS, são excludentes uma da outra, e provocam a ativação constitutiva das serina-treonina quinases na via ERK-MAPK estimulando o crescimento nas células do melanoma.<sup>19, 38-42</sup> A mutação do KIT é a mais frequente nos melanomas de mucosa (15 a 22%), acrais e de áreas do corpo com dano solar crônico, e nestes pacientes a mutação do BRAF não está presente.<sup>43-46</sup>

### 2.2.3 Fatores Patológicos

Dados epidemiológicos sustentam duas importantes vias na patogênese do melanoma cutâneo: uma pela exposição solar cumulativa em pessoas sensíveis ao sol; e outra pela exposição precoce ao sol e predisposição à nevos, promovida por fatores do indivíduo, exposição solar intermitente, ou ambos.<sup>47</sup> De 25 a 33% dos melanomas cutâneos derivam de um nevo melanocítico benigno, enquanto que, em pacientes com numerosos nevos, esse número pode chegar a 50%.<sup>48, 49</sup> A transformação de nevo para melanoma ocorre mais comumente em pele sem dano crônico pelo sol, com menor carga mutacional, em pacientes mais jovens e localizados no tronco.<sup>47, 50</sup> Por outro lado, os pacientes com poucos nevos tendem a desenvolver melanomas na pele habitualmente exposta ao sol, e em idades mais avançadas, com maior carga mutacional e principalmente na região da cabeça e pescoço.<sup>51, 52</sup>

O desenvolvimento do melanoma apresenta passos clinicamente distintos e histologicamente discerníveis (Figura 7):

- 1) melanoma confinado acima da membrana basal epidérmica, chamado de melanoma *in situ* fase-confinado com crescimento radial;
- 2) melanoma que penetra o limite da membrana basal para entrar na derme papilar superficial, chamado de melanoma micro-invasivo fase-confinado com crescimento radial; e
- 3) melanoma que invade a derme e que adquire a capacidade de crescimento metastático, manifestando-se tipicamente como um nódulo tumoral e/ou com extensão para dentro da derme reticular, que é chamado de melanoma com fase de crescimento vertical.

O melanoma em humanos foi dividido em vários subtipos histológicos, incluindo o melanoma *in situ*, lentigo maligno, melanoma de crescimento superficial, o melanoma lentigo maligno, o melanoma nodular, o melanoma lentiginoso acral e outras formas menos comuns.<sup>53-56</sup>

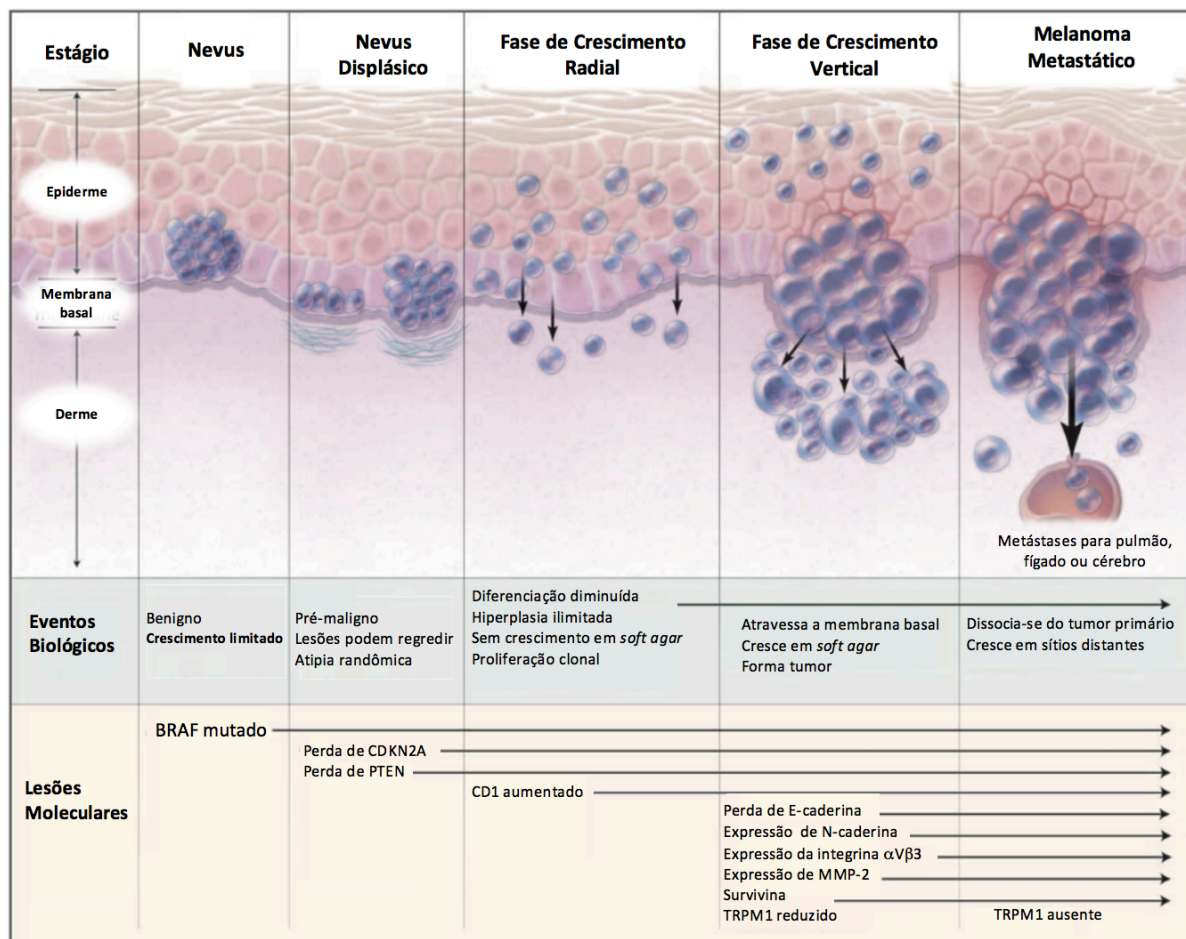


Figura 7. Eventos biológicos e alterações moleculares na progressão do melanoma  
MAPK, mitogen-activated protein kinase; CDKN2A, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; PTEN, phosphatase and tensin homologue; MITF, microphthalmia-associated transcription factor; TRPM1, melanocyte-specific gene melastatin 1; MMP-2, matrix metalloproteinase 2. Fonte: Miller AJ et al. Melanoma. N Engl J Med 2006;355:p55

#### 2.2.4 Diagnóstico e Fatores Prognósticos

Uma história detalhada deve ser obtida daqueles pacientes com lesão de pele suspeita de melanoma. Estes, devem ser submetidos ao exame de toda a pele, com cuidado especial para a área de drenagem linfática da lesão suspeita.<sup>56-58</sup> Uma maior incidência é encontrada no sexo masculino, com a maioria dos diagnósticos ocorrendo na quarta década de vida e raramente na infância. Fatores de risco - história prévia de melanoma ou em familiar de primeiro grau, pele

clara, queimaduras de pele pelo sol na juventude, etnia branca, cabelos loiros ou ruivos, nevos displásicos ou imunossupressão - devem ser investigados para uma adequada avaliação quanto ao risco para o desenvolvimento de melanoma. A localização mais comum é o tronco (43,5%), seguido pelas extremidades (10,7%), região da cabeça e pescoço (10,7%) e localizações acrais (11,9%).<sup>59</sup> Embora existam controvérsias quanto à recomendação em relação ao uso de rotinas de rastreamento, os pacientes devem ser educados em relação ao autoexame da pele e a regra ABCDE para identificação de lesões suspeitas – **A**ssimetria, **B**ordas irregulares, **C**oloração variegada, aumento do **D**iâmetro e **E**volução da lesão.<sup>57, 60</sup> O maior estudo de base populacional sobre rastreamento de melanoma, chamado de SCREEN (Skin Cancer Research to Provide Evidence for Effectiveness of Screening in Northern Germany) foi conduzido no estado federado de Schleswig-Holstein, localizado no extremo norte da Alemanha e com uma das mais altas incidências de câncer de pele.<sup>61</sup> Durante o período de julho de 2003 à junho de 2004, foram incluídos 265.306 mulheres e 94.982 homens, com a idade mínima de 20 anos, submetidos ao exame de corpo inteiro realizado por médicos gerais e/ou dermatologistas.<sup>61</sup> O programa SCREEN foi associado com um aumento da incidência de melanoma, em função da identificação de um maior número de cânceres de pele, quando comparadas as taxas pré e pós-SCREEN em Schleswig-Holstein e quando comparado a outro estado federativo que não participou do programa de rastreamento.<sup>61</sup> Em 2008 foi introduzido na Alemanha o programa nacional de rastreamento de câncer de pele, o qual não conseguiu reduzir a mortalidade pelo melanoma.<sup>62</sup> Na região de Schleswig-Holstein houve uma redução da mortalidade até 2008 e após voltou a aumentar, tornando-se novamente mais alta do que a média geral na Alemanha.<sup>62</sup>

Lesões cutâneas pequenas (< 2 cm) e suspeitas de melanoma deverão ser submetidas, conforme as diretrizes do NCCN, à biópsia excisional orientada longitudinalmente e com 1-3 mm de margens. Margens maiores são evitadas nos casos em que é necessário realizar o mapeamento linfático ou a biópsia do linfonodo sentinela. Para lesões maiores, ou lesões localizadas em áreas de maior sensibilidade ou em regiões anatômicas de difícil cicatrização (face, couro cabeludo, orelhas, superfícies palmar e plantar, regiões subungueais e digitais), a biópsia incisional de toda profundidade é a alternativa preferida. A biópsia incisional deve ser realizada na área de maior pigmentação e mais endurecida da lesão.<sup>57, 63, 64</sup>

O sistema de estadiamento (Tabelas 1 e 2) mundialmente aceito é o elaborado pelo American Joint Committee (AJCC), cuja última versão, foi publicada em 2017, como a oitava edição.<sup>65</sup> E, para fins práticos, os pacientes são categorizados, segundo a classificação TNM (espessura da lesão, comprometimento linfonodal e presença de metástases), como tendo

doença localizada (estágio I-II), doença regional (estágio III) ou doença metastática (estágio IV).<sup>66</sup>

Tabela 1. Definição de tumor primário -TNM

Classificação	Espessura (mm)	Status de Ulceração
TX (espessura não pode ser avaliada)	NA	NA
T0 (nenhuma evidência do tumor primário)	NA	NA
Tis ( <i>in situ</i> )	NA	NA
T1	≤ 1,00	desconhecido ou não especificado
T1a	< 0,8mm	sem ulceração
T1b	< 0,8mm	com ulceração
	0,8 – 1,0mm	com ou sem ulceração
T2	>1,0 – 2,0mm	desconhecido ou não especificado
T2a	>1,0 – 2,0mm	sem ulceração
T2b	>1,0 – 2,0mm	com ulceração
T3	>2,0 – 4,0mm	desconhecido ou não especificado
T3a	>2,0 – 4,0mm	sem ulceração
T3b	>2,0 – 4,0mm	com ulceração
T4	> 4,0mm	desconhecido ou não especificado
T4a	> 4,0mm	sem ulceração
T4b	> 4,0mm	com ulceração

Fonte: adaptado de AJCC Cancer Staging Manual 8ª Edição, 2017

Abreviações: NA, não aplicável

Tabela 2. Definição de linfonodo regional - TNM

N	Nº de Linfonodos Metastáticos	Metástase em trânsito, e/ou microssatélite
NX	Linfonodos regionais não avaliados	Não
N0	0	Não
N1	1 linfonodo com tumor, ou metástase em trânsito, satélite, e/ou metástase microssatélite, sem linfonodo comprometido	
N1a	1 clinicamente oculta	Não
N1b	1 clinicamente detectada	Não
N1c	nenhum linfonodo regional comprometido	Sim
N2	2 ou 3 linfonodos com tumor, ou metástase em trânsito, satélite, e/ou metástase microssatélite com 1 linfonodo comprometido	
N2a	2 ou 3 clinicamente oculto	Não
N2b	2 ou 3, e ao menos 1 clinicamente detectado	Não
N2c	1 clinicamente oculto ou detectado	Sim
N3	4 ou mais linfonodos metastáticos, ou metástase em trânsito, satélite, e/ou metástase microssatélite, com 2 ou mais linfonodos comprometidos, ou qualquer número de linfonodos fusionados,	

Continuação...		
	sem ou com metástases satélites, em trânsito	
N3a	4 ou mais clinicamente oculto	Não
N3b	4 ou mais, e ao menos 1 clinicamente detectado ou qualquer número de linfonodos fusionados	Não
N3c	2 ou mais clinicamente oculto ou detectado, e ou presença de qualquer número de linfonodos fusionados	Sim

Fonte: adaptado de AJCC Cancer Staging Manual 8ª Edição, 2017

Tabela 3. Definição de metástase à distância - TNM

Categoria M	Critério M	
	Sítio anatômico	Nível de DHL
M0	Nenhuma evidência de metástase à distância	Não aplicável
M1	Evidência de metástase à distância	Ver abaixo
M1a	Metástase à distância para a pele, tecidos moles incluindo músculo, e/ou linfonodo regional	Não registrado ou não especificado
M1a(0)		Não elevado
M1a(1)		Elevado
M1b	Metástase para pulmão com ou sítios M1a	Não registrado ou não especificado
M1b(0)		Não elevado
M1b(1)		Elevado
M1c	Metástase à distância para sítios viscerais, exceto SNC, com ou sítios M1a e M1b	Não registrado ou não especificado
M1c(0)		Não elevado
M1c(1)		Elevado
M1d	Metástase à distância para SNC, com ou sítios M1a, M1b ou M1c	Não registrado ou não especificado
M1d(0)		Não elevado
M1d(1)		Elevado

Fonte: adaptado de AJCC Cancer Staging Manual 8ª Edição, 2017

Abreviações: NA, não aplicável; DHL, desidrogenase láctica



Tabela 4. Grupo de estágios anatômicos para o melanoma cutâneo - TNM

	Estágio Clínico			Estágio Patológico			
	T	N	M	T	N	M	
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	IA	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0	IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	T <sub>qq,Tis</sub>	N>N0	M0	IIIB	T0	N1b, N1c	M0
IV	T <sub>qq</sub>	N <sub>qq</sub>	M1	IIIC	T0	N2b, N2c, N3b ou N3c	M0
				IIIA	T1a/b-T2a	N1a ou N2a	M0
				IIIB	T1a/b-T2a	N1b/c ou N2b	M0
				IIIB	T2b-T3a	N1a-N2b	M0
				IIIC	T1a-T3a	N2c ou N3a/b/c	M0
					T3b/T4a	N1ou >N1	M0
					T4b	N1a-N2c	M0
				IIID	T4b	N3a/b/c	M0
				IV	T <sub>qq,Tis</sub>	N <sub>qq</sub>	M1

Fonte: adaptado de AJCC Cancer Staging Manual 8ª Edição, 2017

Em 1969, Clark categorizou a invasão do melanoma em cinco níveis (Tabela 5), uma vez que vários estudos revelaram existir associação entre a profundidade da invasão do tumor e o prognóstico.<sup>54, 67-71</sup> Entretanto, vários investigadores demonstraram que o nível de invasão é menos reprodutível entre os patologistas, e possui menor acurácia em fornecer informações prognósticas quando comparado à espessura do tumor em milímetros.<sup>72</sup>

Tabela 5. Níveis de invasão de Clark

Níveis de invasão de Clark	
I	células melanocíticas malignas <i>in situ</i>
II	invasão além da membrana basal restrita a derme papilar
III	invasão tumoral atingindo parte da derme reticular
IV	invasão tumoral de toda a derme reticular
V	invasão do tecido celular subcutâneo

Adaptado de: Clark WH, Jr. A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biological behaviour. In: Montagna W, Hu F, eds. *Advances in the Biology of the Skin*. New York: Pergamon; 1967:621-47.

A outra forma de classificar o melanoma, a espessura (Tabela 5) do tumor em milímetros, foi introduzida como fator prognóstico por Alexander Breslow em 1970, sendo identificado um significativo decréscimo na sobrevida à medida que a espessura do tumor aumenta.<sup>66, 72, 73</sup>

Tabela 6. Índice de espessura de Breslow

Índices de espessura de Breslow	
I	espessura menor que 0,75 mm
II	espessura menor de 0,75 a 1,5 mm
III	espessura menor de 1,6 a 3,0 mm
IV	espessura menor de 3,1 a 4,0 mm
V	espessura maior que 4 mm

Adaptado de: Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172:902-8.

A taxa mitótica, obtida pela contagem do número de mitoses em um milímetro quadrado, que anteriormente era usada como critério de estagiamento em tumores com até 1mm (T1) de espessura, foi removida na última versão do AJCC, mas permanece como um importante fator prognóstico.<sup>65</sup> Conforme Thompson et al., a medida que o número de mitoses aumenta, as taxas de sobrevida declinam, com sobrevida em 10 anos variando de 93,2% para pacientes com taxa mitótica de 0 mitoses/mm<sup>2</sup> a 47,6% para aqueles com mais de 20 mitoses/mm<sup>2</sup>. A análise multivariável nesse estudo identificou espessura do tumor, taxa mitótica, idade (pior prognóstico acima dos 60 anos), ulceração, sítio anatômico e sexo (melhor prognóstico para o sexo feminino), como os fatores prognósticos mais importantes.<sup>74</sup>

A presença de ulceração, não atribuída ao trauma, confere um prognóstico significativamente pior.<sup>75-77</sup>

Tumores localizados nas regiões da cabeça e pescoço e tronco apresentam um pior prognóstico em relação a melanomas primários de outras localizações.<sup>77, 78</sup>

A satelitose é caracterizada pela presença de nódulos dérmicos ou subcuticulares, maiores do que 0,05 mm, claramente separados e não contíguos ao componente de crescimento vertical primário do tumor. A presença de lesões satélites também está associada a um decréscimo na sobrevida livre de doença e global.<sup>79-82</sup>

Não está claro se a presença de invasão vascular é um fator prognóstico independente, entretanto, a sua frequência aumenta com a profundidade e o nível da invasão tumoral. Enquanto que a invasão linfática parece ser um preditor de metástases.<sup>82</sup>

A presença de linfocitose tumoral significativa confere um melhor prognóstico; por outro lado, a ausência de linfocitose ou a presença discreta, foram associadas com recorrência de forma independente, diminuindo a sobrevida livre de doença em 5 anos.<sup>83</sup>

Fator prognóstico controverso, a regressão completa é caracterizada por uma área de ausência de crescimento melanocítico na epiderme e na derme, delimitada em um ou ambos os lados pelo melanoma. Alguns autores sugerem um pior prognóstico, onde a regressão de mais do que 75% do tumor parece ser o volume crítico que prevê o surgimento de metástases.<sup>84, 85</sup> Outros autores sugerem, no entanto, que a regressão é um sinal de sucesso da resposta imunológica do paciente contra o tumor.<sup>83</sup>

### 2.2.5 Tratamento

Apesar do aumento da incidência, principalmente em regiões onde a população possui ascendência nórdica e exposição à alta intensidade de radiação UV, a taxa de sobrevida tem melhorado significativamente, principalmente, devido à detecção precoce. No entanto, o prognóstico de pacientes com doença metastática é bastante desapontador, com uma sobrevida mediana inferior a 1 ano e uma taxa de mortalidade em 5 anos de aproximadamente 90%. Historicamente, a abordagem terapêutica para o melanoma metastático incluía quimioterapia citotóxica, imunoterapia baseada em interleucina ou interferon, e combinações de quimioterapia e imunoterapia (bioquimioterapia). Infelizmente, nenhuma dessas abordagens apresentou um benefício em relação à sobrevida, em estudos randomizados, e bem controlados, fase III.<sup>86</sup>

Recentemente, com a elucidação de algumas alterações genéticas somáticas responsáveis pela formação do melanoma, novas abordagens terapêuticas estão sendo desenvolvidas. Esse novo cenário envolve duas modalidades: imunoterapia e terapia-alvo (Figuras 8 e 9). Um exemplo da nova imunoterapia é o ipilimumabe, um anticorpo com afinidade pelo receptor CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*) encontrado na superfície dos linfócitos T. Como esse receptor diminui a resposta imune ao estímulo provocado pela apresentação do antígeno, a sua inibição permitiria a efetiva atividade do linfócito T. Embora apresente uma taxa de resposta modesta, essa droga demonstrou um importante impacto no controle da doença metastática a longo prazo (além do terceiro ano) em torno de 20%.<sup>17, 87</sup> O tratamento com ipilimumabe resultou em uma sobrevida em 3 anos em torno de 26% em pacientes sem tratamento prévio, e 20% em pacientes previamente tratados.<sup>88</sup> A SG mediana variou de 10,1 meses a 19,9 meses, e a taxa de resposta entre 11% e 19%.<sup>87, 89-93</sup> Com um

mecanismo semelhante, mas atuando em outro receptor, o PD-1 (*programmed cell death-1*), foram desenvolvidas outras drogas (nivolumabe, pembrolizumabe) que aumentam a resposta imunológica contra a célula tumoral, e que apresentaram eficácia superior, com melhores taxas de resposta e menor toxicidade, quando comparados à quimioterapia e ao ipilimumabe.<sup>17, 94</sup> Em pacientes sem tratamento prévio, nivolumabe apresentou uma taxa de resposta global (RG) de 40% (estudo Checkmate 66); enquanto que em pacientes previamente tratados, a taxa de RG foi de 27% (estudo Checkmate 37).<sup>95, 96</sup> O estudo fase 3 Keynote 6, avaliou pacientes com e sem tratamento prévio, encontrando taxas de RG de 37% com pembrolizumabe a cada 2 semanas e 36% a cada 3 semanas.<sup>93, 97</sup> Posteriormente, nos estudos Checkmate 67 e 69, foi avaliada a combinação de nivolumabe com ipilimumabe, alcançando taxas de RG de 58 e 59%, respectivamente.<sup>92, 98</sup>

Com relação as drogas com alvos moleculares específicos, destacam-se os inibidores de BRAF (vemurafenibe e dabrafenibe) e de MEK (trametinibe e cobimetinibe), com importantes taxas de resposta objetiva.<sup>99-102</sup> Vários estudos randomizados fase 3 mostraram taxas de resposta objetiva com inibidores de BRAF (BRAFi) de aproximadamente 50%, podendo alcançar 70% quando combinados com inibidores de MEK (MEKi).<sup>103-106</sup> Embora a resposta completa tenha sido relatada em apenas 16% dos casos, a taxa de controle da doença - resposta completa, resposta parcial ou doença estável - ultrapassou 90%, revelando que quase todos os pacientes se beneficiam inicialmente desse tratamento.<sup>17</sup> Outro efeito dessa combinação, foi a redução da ativação paradoxal da via MAPK pelo BRAFi, resultando em uma redução da toxicidade cutânea e do desenvolvimento de câncer de pele não-melanoma.<sup>103-107</sup> O BRAFi também apresenta rápida resposta, independente do volume tumoral e da localização das metástases; além de apresentar eficácia nas metástases cerebrais, aonde a resposta é de até 55% com o uso combinado de dabrafenibe e trametinibe.<sup>108</sup> A SG mediana em pacientes tratados com a combinação de BRAFi e MEKi está entre 22 e 25 meses, e a SG de 3 a 5 anos atingiu 40%.<sup>17</sup> Em pacientes com BRAF selvagem e mutação de NRAS, o uso de binimetinibe, um MEKi, mostrou uma taxa de resposta de apenas 15% e uma sobrevida livre de progressão de 2 a 8 meses.<sup>109</sup> No subgrupo raro de pacientes com mutação de KIT, o uso de inibidores de tirosina quinase, como o nilotinibe, alcançou taxas de resposta de 26%, e 46% de estabilização da doença.<sup>110</sup> Múltiplos mecanismos de resistência contra BRAFi e MEKi tem sido identificados, os quais levam a reativação da sinalização da via MAPK ou ativação da via PI3K-AKT.<sup>17</sup>

Recentemente, as novas imunoterapias (anti-CTLA4 e anti-PD1) e as terapias alvo (BRAFi e MEKi) estão sendo indicadas também no cenário da adjuvância em pacientes com alto risco de recidiva.<sup>111</sup>

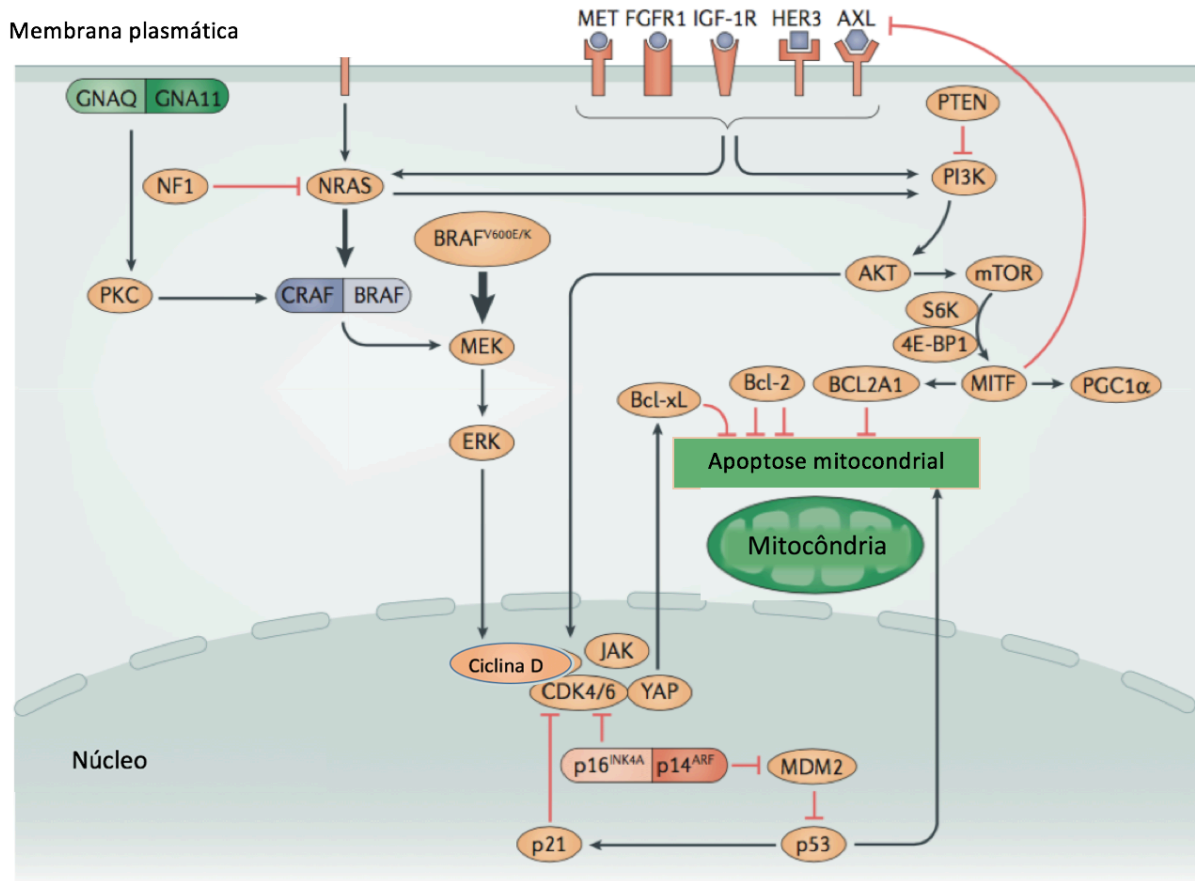


Figura 8. Resumo das principais vias de sinalização molecular relacionadas com a carcinogênese do melanoma

Fonte: Adaptado de Luke JJ et al. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:463-82.

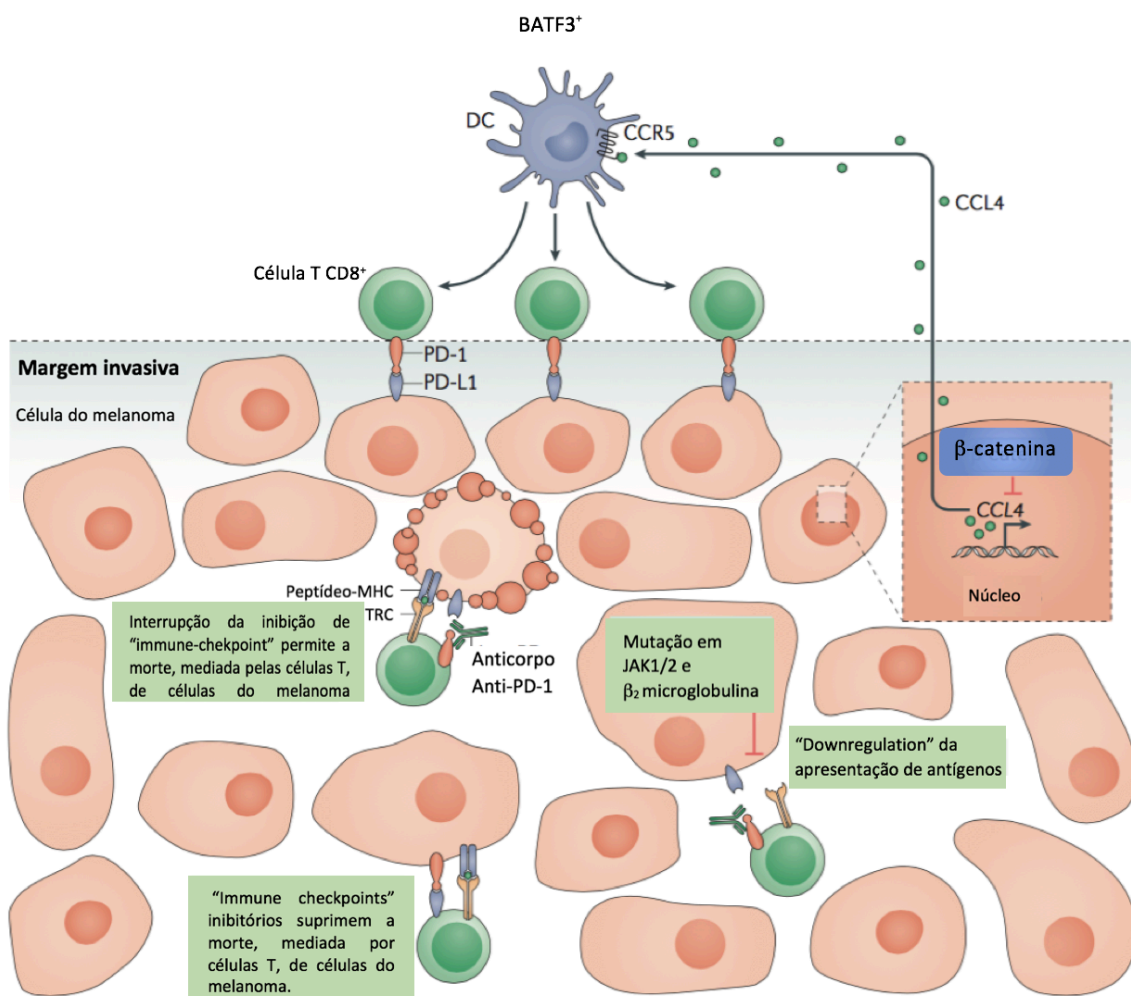


Figura 9. Resumo das interações imunológicas no microambiente do melanoma

Fonte: Luke JJ et al. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:463-82.

### 2.3 Receptores da Tropomiosina Relacionados à Quinase e Neurotrofinas

Os receptores de tirosina relacionados à quinase (RTK) são proteínas da superfície celular que, depois de ativados por fatores de crescimento, estimulam vias intracelulares controlando a sobrevivência, o metabolismo e a proliferação das células.<sup>112</sup> Os receptores de tropomiosina relacionados à quinase (TRK) constituem uma família de RTK ativados por neurotrofinas. TrkA, TrkB e TrkC são os receptores para o fator de crescimento neural (NGF, do inglês nerve growth factor), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês brain-derived neurotrophic factor) e neurotrofina-3 (NT-3, do inglês neurotrophin-3), respectivamente.<sup>113</sup> As neurotrofinas apresentam uma ampla variedade de funções, tanto em tecidos neuronais, como em outros tecidos, controlando vários processos fisiológicos em

adultos, assim como no desenvolvimento embrionário.<sup>114</sup> Fisiologicamente, esses receptores e suas neurotrofinas (NTs) apresentam maior expressão no tecido neuronal, enquanto que na pele a expressão é bem menor (Figuras 10 e 11), conforme a análise da expressão de proteínas de uma seleção de amostras dos principais tecidos do corpo humano, apresentada pelo Human Protein Atlas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)).<sup>115-117</sup> Embora os TRKs sejam preferencialmente ativados pelas NTs, regulando o crescimento, a diferenciação e morte celular; elas também possuem funções de sinalização independentes das NTs.<sup>114</sup> A fusão do gene TRK com o gene da tropomiosina no domínio extracelular, confere uma ativação constitutiva da atividade de tirosina quinase, induzindo a uma contínua proliferação celular.<sup>118</sup>

Vários estudos têm investigado o papel das NTs e dos receptores do tipo TRK em diversos tumores, apresentando resultados conflitantes com relação ao envolvimento dessa sinalização e o prognóstico.<sup>11, 119-130</sup> Por exemplo, os pacientes com neuroblastoma e expressão aumentada de TrkA e TrkC, apresentam melhor prognóstico, enquanto que aqueles com hiperexpressão do TrkB e de seu ligante, o BDNF, apresentam pior prognóstico.<sup>131, 132</sup> Dessa forma, a via BDNF/TrkB pode estar envolvida no crescimento, desenvolvimento de metástases e resistência ao tratamento em vários tipos de tumores.<sup>118, 133, 134</sup>

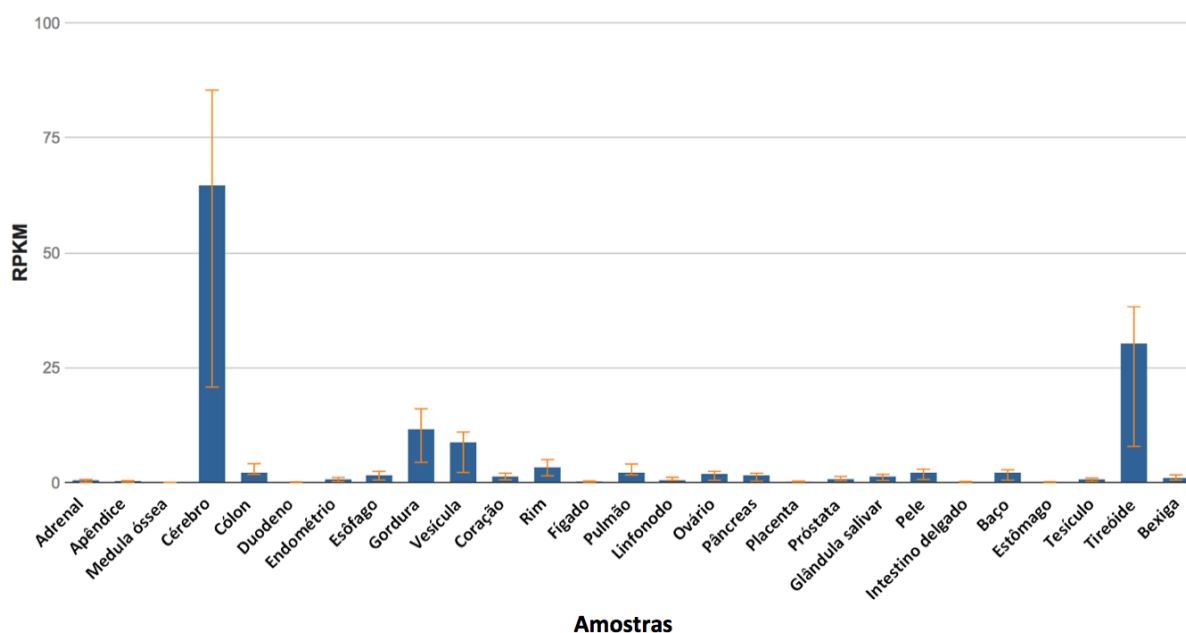


Figura 10. Expressão de TrkB em amostras de diferentes tecidos humanos RPKM, reads per kilobase per million mapped reads

Fonte: NCBI – Gene

Acessível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4915#gene-expression>.

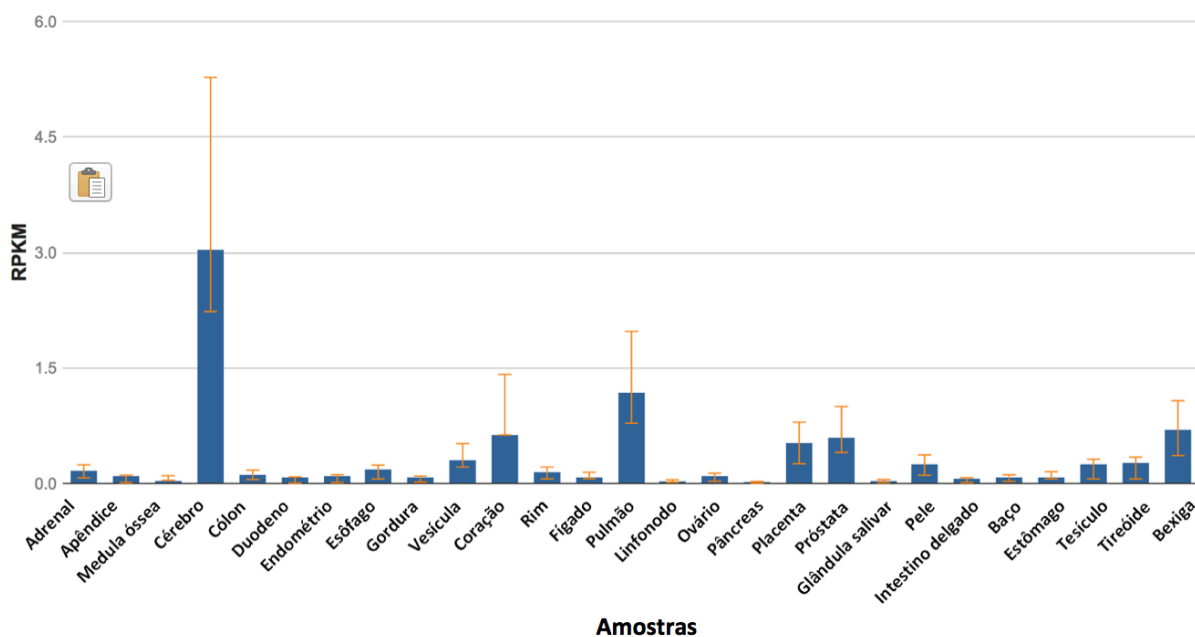


Figura 11. Expressão de BDNF em amostras de diferentes tecidos humanos RPKM, reads per kilobase per million mapped reads

Fonte: NCBI – Gene

Acessível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/627>

## 2.4 Receptores da Tropomiosina Relacionados à Quinase e o Melanoma

A membrana basal do endotélio vascular é uma importante barreira que as células neoplásicas necessitam penetrar para alcançar órgãos distantes.<sup>135</sup> Durante a invasão tumoral, a membrana basal torna-se desorganizada devido às alterações na expressão e organização de seus constituintes, e à degradação enzimática.<sup>136-139</sup>

Células de melanoma respondem a certas neurotrofinas, aumentando a produção de enzimas de degradação da matriz extracelular.<sup>139, 140</sup> As neurotrofinas - NGF, NT-3, BDNF e NT4/5 – podem se ligarem ao receptor de neurotrofina de baixa afinidade, identificado como p75<sup>NTR</sup>, e aos receptores de alta afinidade representados pela família dos TRKs.<sup>141-144</sup>

Com origem na crista neural, os melanócitos apresentam uma produção aumentada do receptor de neurotrofina de baixa afinidade, identificado como p75<sup>NTR</sup>.<sup>145</sup> Com capacidade de internalizar o NGF, principalmente em microambientes como o tecido cerebral, o p75<sup>NTR</sup> é capaz de regular a capacidade de invasão das células do melanoma no sistema nervoso central.<sup>146</sup> Outras neurotrofinas, como NT-3, BDNF e NT4/5, também podem se ligar ao p75<sup>NTR</sup>. Entretanto, conforme descrito por Marchetti et al., a capacidade de invasão das células do melanoma está seletivamente aumentada apenas quando estas são expostas ao NGF ou ao



NT-3; mas não com BDNF, NT4/5, NGF mutado (incapaz de se ligar ao p75<sup>NTR</sup>) ou outros fatores não-neuronais.<sup>137</sup>

Com relação a expressão dos receptores TRK nas células de melanoma, a literatura é escassa e os dados são controversos. Em 1995, Easty et al. publicaram um trabalho revelando ausência de expressão de TrkA na cultura de melanócitos normais e de 19 linhagens de células de melanoma.<sup>147</sup> Por outro lado, em 2001, Innominato et al. publicaram um estudo que incluiu 15 amostras de melanoma cutâneo, 12 amostras de metástases de melanoma e 16 amostras de lesões pigmentares normais. Através de imuno-histoquímica, eles encontraram uma expressão maior de BDNF, NGF, NT-3, TrkB e TrkC, em amostras de melanomas e metástases, do que nas lesões benignas ou na pele normal.<sup>148</sup>

Em 2003, Xu et al. avaliaram a expressão de TrkC em 63 amostras de melanoma cutâneo e em 10 nevos, encontrando uma expressão de 30% nas lesões benignas e 60% nas amostras de melanoma. Neste estudo, a frequência na expressão de TrkC revelou um aumento à medida que o melanoma progride das lesões *in situ* (58%) para a invasão da camada papilar dérmica (91%), e então, uma diminuição com a invasão da derme profunda (57%) e com a formação de metástase (31%).<sup>149</sup>

Em 2004, Florenes et al. publicaram os resultados da análise, por imuno-histoquímica, da expressão de TrkA em 152 amostras de lesões primárias de melanoma cutâneo e 64 amostras de metástases. Sendo encontrada expressão de TrkA em 54,6% das lesões primárias e 30% das metástases. Também identificaram uma associação da expressão com o subtipo nodular, a espessura dos tumores e a presença de ulceração.<sup>150</sup>

Recentemente, Pasini et al. analisaram 31 amostras de melanoma, identificando a amplificação do gene 1q23.1, no qual está situado o locus de TrkA, como implicada na progressão do melanoma. No mesmo estudo, eles identificaram por PCR, a expressão desse receptor em 50% de 64 casos de melanoma, e uma associação com pior prognóstico. Ainda, eles induziram a ativação da sinalização NGF-TrkA em uma linhagem de células de melanoma, produzindo um fenótipo de supressão da proliferação celular, com inibição da divisão celular e pronunciada vacuolização intracelular. Estes eventos foram ativados via MAPK, sugerindo uma compensação entre a transformação neoplásica e a resposta anti-proliferativa, através da sinalização NGF-TrkA-MAPK.<sup>151</sup>

Já as publicações referentes à expressão de TrkB e o Melanoma, limitam-se à avaliação desse receptor em metástases cerebrais, melanoma uveal ou em estudos com cultura de células<sup>152</sup>. Não havendo, com exceção de um estudo com pequeno número de pacientes

publicado por Innominato et al., outras publicações avaliando a expressão de TrkB na lesão cutânea primária do melanoma, bem como a sua interferência no prognóstico dessa doença.<sup>148</sup>

Vários estudos em outras neoplasias – neuroblastoma, adenocarcinoma de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de colo uterino, tumor de Wilms, câncer de ovário, adenocarcinoma de pâncreas e de cólon – sugerem que a expressão aumentada de BDNF e TrkB, promovem o crescimento, a invasão e a capacidade de metastizar, além de promover resistência à quimioterapia.<sup>113</sup> Outros mecanismos de ação pró-oncogênicos do TrkB envolvem a regulação de vias de ativação de proteína-quinases (PI3K, MAPK e PKC), supressão da anoikis (apoptose resultante da perda de interação da célula com a matriz), e a possível estimulação da angiogênese tumoral.<sup>118, 133, 134, 153-155</sup>

Sabe-se que a fosforilação do TrkB, através de sua ligação com a neurotrofina BDNF, também provoca a fosforilação de membros da via MAPK (Figura 12). Lembrando que em aproximadamente 50-60% dos melanomas, essa via é ativada por mutações de BRAF, desencadeando a carcinogênese do melanoma, e tornando a via MAPK, alvo de terapias como os inibidores de BRAF e de MEK.<sup>156-158</sup>

Portanto, essas evidências sugerem que TrkB e BDNF podem apresentar um importante papel prognóstico em várias neoplasias, e, uma vez confirmada essa hipótese, o uso de antagonistas do TrkB, ou anticorpos monoclonais contra TrkB ou BDNF, podem ser investigados como novas terapias para aqueles tumores com expressão alterada de BDNF/TrkB. Além disso, em neoplasias aonde já existem tratamentos cujo alvo encontra-se nessas vias ativadas pelo TrkB, a expressão aumentada dessa proteína também poderá ser investigada como um potencial biomarcador de resposta, resistência ao tratamento ou toxicidade à essas terapias.

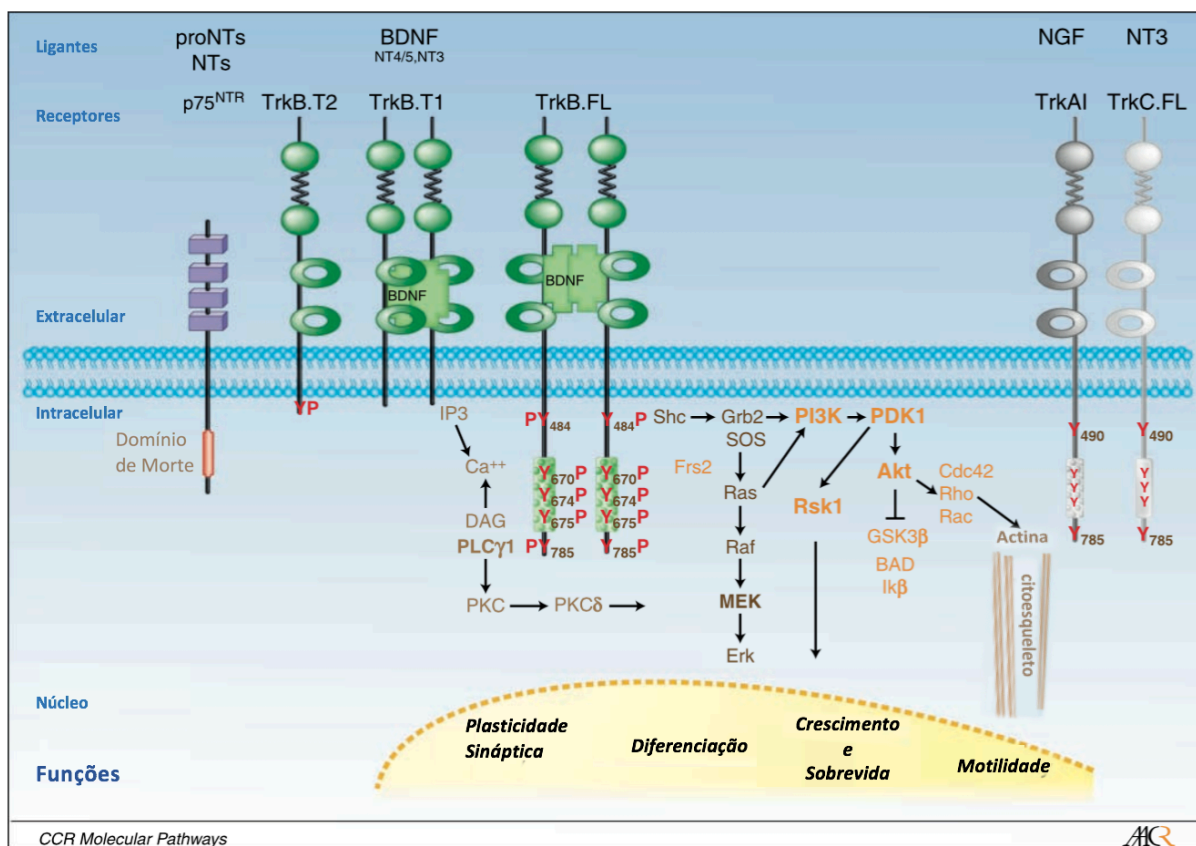


Figura 12. Representação dos receptores TRK e principais vias de transdução de sinal. Os receptores TRK possuem um domínio extra-celular de ligação, uma região transmembrana singular e uma região intracelular de comprimento variável. Os círculos verdes cheios representam as regiões ricas em cisteína, que são separadas por repetições de fibronectina tipo III (linha dentada). Os círculos verdes abertos representam os domínios semelhantes a Ig que se ligam aos monômeros BDNF diméricos levando a dimerização dos receptores TrkB e a ativação do domínio intracelular do TrkB (retângulo preenchido com círculos). A ativação do TrkB leva à fosforilação (P) de um número de tirosinas (Y) no domínio da tirosinoquinase, bem como no domínio justamembrana. Esses resíduos PY servem como locais de encaixe para proteínas citoplasmáticas, como Shc e PLC $\gamma$ , cujo recrutamento, por sua vez, leva à ativação de mediadores a jusante das vias MAPK, PLC $\gamma$  e quinase PI-3. Em última análise, esses sinais são transduzidos para o núcleo para mediar programas de transcrição que regulam as funções celulares, como a plasticidade sináptica, a diferenciação, o crescimento, a sobrevivência e a motilidade. Os outros membros da família TRK, TrkA e TrkC, são representados para ilustrar a conservação estrutural desta família de genes. O P75 é um receptor de pan-neurotrofina.

Fonte: Thiele CJ et al. Clin Cancer Res 2009;15(19)pag.5964

### 3 JUSTIFICATIVA

Recentemente, a identificação das alterações moleculares do ambiente imunológico envolvido no processo de progressão do melanoma, assim como, um maior conhecimento das conexões entre essas vias moleculares e os fatores de risco dessa neoplasia, permitiram o desenvolvimento de novas drogas. Tanto as novas formas de imunoterapias, quanto as novas drogas dirigidas a alvos específicos, apresentaram melhores taxas de resposta e um melhor perfil de toxicidade, mas ainda assim, apresentam limitações como a seleção do paciente e os elevados custos.

A expressão do TrkB já foi estudada em outras neoplasias, conferindo, em geral, um pior prognóstico e resistência ao tratamento citotóxico. Devido a relevância do melanoma em termos de morbidade, mortalidade e com a elevação das suas taxas de incidência nas últimas décadas, nós examinamos o perfil da expressão do TrkB, e do seu ligante, o BDNF, no melanoma, afim de avaliar o comportamento dessas expressões durante as diferentes fases de progressão do melanoma e os seus papéis como fatores prognósticos; identificando um possível alvo terapêutico para essa neoplasia. Estudos anteriores pesquisaram a expressão do TrkB no melanoma uveal e nas metástases cerebrais de melanoma, porém, não havia sido avaliada a associação dessa expressão com a progressão e com o prognóstico no melanoma cutâneo, embora esta seja a apresentação mais frequente dessa neoplasia.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Determinar a frequência da expressão do TrkB e BDNF no material de biópsias de pacientes portadores de melanoma cutâneo.

### **4.2 Objetivos Específicos**

a) Determinar a expressão do TrkB nas amostras de biópsias de melanoma cutâneo, oriundas do sítio primário ou metastático.

b) Determinar a expressão de BDNF, TrkA e NGF, nas amostras de biópsias de melanoma cutâneo, oriundas do sítio primário ou metastático.

c) Relacionar a expressão do TrkB com os diferentes níveis de espessura de Breslow e de invasão de Clark, presença de ulceração, índice mitótico, infiltrado linfocitário, estadiamento TNM, SLR e SG.

d) Relacionar a expressão de BDNF, TrkA e NGF, com os diferentes níveis de espessura de Breslow e de invasão de Clark, presença de ulceração, índice mitótico, infiltrado linfocitário, estadiamento TNM, SLR e SG.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Delineamento

Foi realizado um estudo transversal, onde o fator de estudo foi o diagnóstico histológico de melanoma cutâneo, e o desfecho, o perfil de expressão do TrkB.

Questão de pesquisa: A expressão do TrkB está alterada no melanoma cutâneo?

Hipótese: Nas células do melanoma cutâneo ocorre um aumento da expressão do TrkB.

Após essa primeira etapa, com a identificação da associação entre a expressão aumentada do TrkB e as outras variáveis estudadas (idade, sexo, localização do tumor primário, tipo histológico, presença de ulceração, índice de Breslow, nível de Clark, estadiamento TNM, índice mitótico, infiltrado intratumoral e peritumoral), foi avaliado, através de uma coorte histórica, o impacto dessa expressão na sobrevida livre de recidiva e sobrevida global. Conjuntamente, foram avaliados também as expressões de BDNF, TrkA e NGF.

### 5.2 Caracterização da Amostra

Utilizando uma amostragem aleatória, de um total de 148 pacientes selecionados por apresentarem os registros necessários para a coleta das informações clínicas, através dos registros hospitalares; posteriormente, foram excluídos 9 pacientes por apresentarem material insuficiente para realização da imuno-histoquímica (IH). Dos 139 pacientes incluídos, em 15 pacientes foram analisadas amostras da lesão primária e de um sítio de metástase, totalizando 154 amostras de biópsias de melanoma, armazenadas em blocos de parafina e arquivadas no Departamento de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e do Serviço de Patologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), registrados no período de 2004 a 2012. A seleção das amostras de melanoma deveria preencher os seguintes critérios de inclusão e exclusão, conforme listado abaixo.

Critérios de inclusão:

- 1) Diagnóstico por exame histológico ou, quando necessário, por IH, de melanoma cutâneo.
- 2) Obtenção da amostra realizada entre 01/01/2004 e 31/10/12.

Critérios de exclusão:

- 1) Diagnóstico de outra neoplasia em estágio avançado, ou outra doença grave, que poderiam interferir diretamente na sobrevida do paciente.

- 2) Diagnóstico de melanoma não cutâneo (mucosa, ocular).
- 3) Não localização da amostra, armazenadas em bloco de parafina, nos arquivos dos serviços de patologia do HCPA e HUSM.
- 4) Não identificação de área de tecido tumoral na amostra submetida a coloração com Hematoxilina-Eosina.
- 5) Ausência de registro de dados nos prontuários, que poderiam comprometer a coleta das variáveis em estudo.

No laboratório de Patologia do Serviço de Pesquisa Experimental do HCPA, após a identificação da porção mais representativa de cada amostra de melanoma, da lesão primária na pele e/ou da metástase, por exame em coloração com Hematoxilina-Eosina, foi realizado o exame imuno-histoquímico para avaliar a expressão de TrkA, TrkB, NGF e BDNF.

A partir de cada um dos 154 blocos de parafina com amostras de melanoma, e 48 blocos com pele normal ou lesão pigmentar benigna, foram montados cortes de três micras de espessura em lâminas revestidas com organossilano. Para realização do exame de IH, as lâminas foram aquecidas em estufa a 80°C por 30 minutos, desparafinadas em xilol, re-hidratadas em álcool etílico e depois em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria por 20 minutos a 95°C em tampão citrato (pH 6,0) e resfriada por 10 minutos. A inativação da peroxidase endógena foi obtida por imersão em peróxido de hidrogênio a 5% em metanol por 20 minutos. O bloqueio proteico foi realizado com 5% de leite em pó desnatado diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Os seguintes anti-corpos primários diluídos 1:50 em PBS, foram mantidos durante 12 h a 4 °C: policlonal anti-TrkA de cabra (sc-20539, Santa Cruz Biotchnology), policlonal anti-NGF de coelho (sc-33602, Santa Cruz Biotchnology), monoclonal anti-TrkB de camundongo (sc-377218, Santa Cruz Biotchnology) e policlonal anti-BDNF de coelho (sc-20981, Santa Cruz Biotchnology). Foram utilizados dois anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rábano: IgG-H&L anti-cabra de asno (ab7125, Abcam) e IgG anti-coelho de cabra (AP132P, Millipore), na diluição 1: 200. A reação antígeno-anticorpo foi avaliada usando o método de substrato-cromogênio DAB (K3468, Dako Cytomation). O núcleo celular foi levemente contrastado com a hematoxilina.

A imunorreatividade positiva para TrkA, TrkB, BDNF e NGF, foi definida como precipitado de cor marrom na membrana e no citoplasma. As amostras de controle expostas apenas ao anticorpo secundário não apresentaram coloração específica. O patologista que avaliou as IH não teve conhecimento das informações clínicas do paciente.

A expressão de TrkB, BDNF e TrkA foi avaliada quanto a positividade (positivo e negativo), intensidade (fraca, moderada e forte) e porcentagem de células positivas. A expressão de NGF foi avaliada apenas quanto à positividade.

Os resultados da IH foram avaliados em relação a associação com as seguintes variáveis: sexo, idade ao diagnóstico, subtipo histológico do Melanoma, localização do tumor primário, nível de invasão de Clark, índice de espessura de Breslow, presença de ulceração, índice mitótico, presença de infiltrado intra-tumoral e peri-tumoral, estadiamento TNM, SLR e SG.

Um potencial fator de confusão nas análises de sobrevida, entre os grupos com maior ou menor expressão das neurotrofinas e de seus receptores, seriam os tratamentos que os pacientes com estágio IV foram submetidos. Os resultados de SG e SLR poderiam ser afetados pela variação desses tratamentos quimioterápicos. No entanto, um número muito pequeno desses pacientes recebeu tratamento com terapia alvo ou imunoterapia (<5%), a grande maioria recebeu quimioterapia citotóxica, que era o tratamento recomendado como padrão durante a maior parte do período do qual as amostras dos pacientes foram obtidas. E com relação à quimioterapia citotóxica, é importante ressaltar, que nenhum estudo randomizado, controlado e fase III, demonstrou benefício de sobrevida com o uso da quimioterapia no melanoma.<sup>86</sup>

### 5.3 Análise Estatística

As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão; e as qualitativas em percentuais. A unidade de pesquisa considerada foi o paciente com melanoma cutâneo. As variáveis em estudo foram: a expressão de TrkB, BDNF, TrkA e NGF; a idade; o sexo; a localização da lesão primária; o tipo histológico; a presença de ulceração; o índice de Breslow; o nível de Clark; o índice mitótico; a presença de infiltrado linfocitário intra-tumoral e peri-tumoral; e o Estadiamento TNM.

Foram utilizados os testes do qui-quadrado de Pearson, correção de continuidade de Yates ou exato de Fisher, quando adequados, para analisar a associação entre os resultados encontrados na Imuno-histoquímica e as variáveis: idade maior ou menor do que 60 anos, sexo, localização da lesão, tipo histológico, índice de Breslow por categorias, índice mitótico por categorias, nível de Clark, presença de ulceração e presença de infiltrado linfocitário intra e peri-tumoral.

Após a aplicação dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, foi identificada uma distribuição assimétrica das variáveis contínuas: idade, índice de Breslow, índice mitótico e porcentagem de células imunorreagentes. Foram então utilizados nestas variáveis os testes



não-paramétricos, como o teste de Mann-Whitney ou o de Kruskal Wallis.

Para análise de Sobrevida Livre de Recidiva e Sobrevida Global, foi utilizado a curva de Kaplan-Meier; e o teste de Log-Rank, foi utilizado para avaliar a diferença de sobrevida entre os pacientes com e sem hiperexpressão de cada uma das proteínas: TrkB, BDNF, TrkA e NGF. Foi utilizado o modelo de regressão de Cox para ajuste por idade, sexo, nível de Clark, índice de Breslow, presença de ulceração e estadiamento. Foi estabelecido  $p < 0,05$  para considerar os resultados significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa SPSS versão 18.0.

Foram também analisadas, com as mesmas técnicas de imuno-histoquímica, a expressão de TrkB, BDNF, TrkA e NGF, em 28 amostras de biópsia de pele com diagnóstico de nevo melanocítico, 7 amostras de lentigo simples e em 13 amostras de pele normal.

Dados faltantes (*missings*) das variáveis de interesse não foram incluídos nas análises específicas.

## **6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

As amostras de biópsias utilizadas foram provenientes dos arquivos do Serviço de Patologia do HCPA e do Serviço de Patologia do HUSM, não sendo necessária a coleta de novas amostras de tecido, assim como a aplicação de termo de consentimento livre e esclarecido. As informações de cada paciente foram obtidas através da revisão dos prontuários, e os dados compilados e que constarão nas divulgações futuras serão completamente anônimos. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA e da UFSM (GPPG # 14-0550).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. de Melo AC, Wainstein AJA, Buzaid AC, Thuler LCS. Melanoma signature in Brazil: epidemiology, incidence, mortality, and trend lessons from a continental mixed population country in the past 15 years. *Melanoma Res* 2018;28:629-36.
2. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. 2017. (Accessed at <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>.)
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018;68:7-30.
4. Whiteman DC, Green AC, Olsen CM. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. *J Invest Dermatol* 2016;136:1161-71.
5. Miller AJ, Mihm MC, Jr. Melanoma. *N Engl J Med* 2006;355:51-65.
6. Baxter AJ, Hughes MC, Kvaskoff M, et al. The Queensland Study of Melanoma: environmental and genetic associations (Q-MEGA); study design, baseline characteristics, and repeatability of phenotype and sun exposure measures. *Twin Res Hum Genet* 2008;11:183-96.
7. Gershenwald JE, Colome MI, Lee JE, et al. Patterns of recurrence following a negative sentinel lymph node biopsy in 243 patients with stage I or II melanoma. *J Clin Oncol* 1998;16:2253-60.
8. Shah DJ, Dronca RS. Latest advances in chemotherapeutic, targeted, and immune approaches in the treatment of metastatic melanoma. *Mayo Clin Proc* 2014;89:504-19.
9. Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:463-82.
10. Denkins Y, Reiland J, Roy M, et al. Brain metastases in melanoma: roles of neurotrophins. *Neuro Oncol* 2004;6:154-65.
11. Roesler R, de Farias CB, Abujamra AL, Brunetto AL, Schwartzmann G. BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. *Expert Rev Anticancer Ther* 2011;11:1473-5.
12. Laennec R. Sur le melanoses. *Bull Faculte Med Paris* 1812;1:23-6.
13. Shamamian P, Mancini M, Kawakami Y, Restifo NP, Rosenberg SA, Topalian SL. Recognition of neuroectodermal tumors by melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes: evidence for antigen sharing by tumors derived from the neural crest. *Cancer Immunol Immunother* 1994;39:73-83.
14. Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol* 2014;9:239-71.
15. Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration. *Int J Mol Sci* 2009;10:4066-87.

16. Cancer survival and prevalence in Australia: period estimates from 1982 to 2010. *Asia Pac J Clin Oncol*;9:29-39.
17. Schadendorf D, van Akkooi ACJ, Berking C, et al. Melanoma. *Lancet* 2018;392:971-84.
18. Ruifeng G. Biology of Melanoma. In: Crowson ANM, C.M. and Mihm Jr, M.C., ed. *The Melanocytic Proliferations: A Comprehensive Textbook of Pigmented Lesions*. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2014:412.
19. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54.
20. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003;33:19-20.
21. Platz A, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol* 2008;1:395-405.
22. Bauer J, Buttner P, Murali R, et al. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res*;24:345-51.
23. Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2006;126:154-60.
24. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 2006;24:4340-6.
25. Smalley KS, Sondak VK, Weber JS. c-KIT signaling as the driving oncogenic event in sub-groups of melanomas. *Histol Histopathol* 2009;24:643-50.
26. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* 2009;457:599-602.
27. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 2004;122:337-41.
28. Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, et al. Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res* 2006;66:6546-52.
29. Ibrahim N, Haluska FG. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu Rev Pathol* 2009;4:551-79.
30. Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 2006;12:406-14.
31. Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, et al. Molecular Network Associated with MITF in Skin Melanoma Development and Progression. *J Skin Cancer*;2011:730170.

32. Ghosh P, Chin L. Genetics and genomics of melanoma. *Expert Rev Dermatol* 2009;4:131.
33. Potrony M, Carreras E, Aranda F, et al. Inherited functional variants of the lymphocyte receptor CD5 influence melanoma survival. *Int J Cancer* 2016;139:1297-302.
34. Puig S, Potrony M, Cuellar F, et al. Characterization of individuals at high risk of developing melanoma in Latin America: bases for genetic counseling in melanoma. *Genet Med* 2016;18:727-36.
35. Bakos RM, Besch R, Zoratto GG, et al. The CDKN2A p.A148T variant is associated with cutaneous melanoma in Southern Brazil. *Exp Dermatol* 2011;20:890-3.
36. Bauer J, Buttner P, Murali R, et al. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011;24:345-51.
37. Mangana J, Cheng PF, Schindler K, et al. Analysis of BRAF and NRAS Mutation Status in Advanced Melanoma Patients Treated with Anti-CTLA-4 Antibodies: Association with Overall Survival? *PLoS One* 2015;10:e0139438.
38. Welsh CF, Roovers K, Villanueva J, Liu Y, Schwartz MA, Assoian RK. Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol* 2001;3:950-7.
39. Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J* 1999;18:664-74.
40. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 1998;12:3008-19.
41. Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, et al. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene* 1989;4:1363-74.
42. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* 2003;9:6483-8.
43. Gajewski TF. Molecular profiling of melanoma and the evolution of patient-specific therapy. *Semin Oncol* 2011;38:236-42.
44. Flaherty KT. Narrative review: BRAF opens the door for therapeutic advances in melanoma. *Ann Intern Med* 2010;153:587-91.
45. Woodman SE, Davies MA. Targeting KIT in melanoma: a paradigm of molecular medicine and targeted therapeutics. *Biochem Pharmacol* 2010;80:568-74.
46. Posch C, Moslehi H, Feeney L, et al. Combined targeting of MEK and PI3K/mTOR effector pathways is necessary to effectively inhibit NRAS mutant melanoma in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:4015-20.

47. Dimitriou F, Krattinger R, Ramelyte E, et al. The World of Melanoma: Epidemiologic, Genetic, and Anatomic Differences of Melanoma Across the Globe. *Curr Oncol Rep* 2018;20:87.
48. Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol* 2003;139:1620-4; discussion 4.
49. Haenssle HA, Mograby N, Ngassa A, et al. Association of Patient Risk Factors and Frequency of Nevus-Associated Cutaneous Melanomas. *JAMA Dermatol* 2016;152:291-8.
50. Whiteman DC, Stickley M, Watt P, Hughes MC, Davis MB, Green AC. Anatomic site, sun exposure, and risk of cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2006;24:3172-7.
51. 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;24:879-97.
52. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 2016;16:345-58.
53. Clark WH, Jr. A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biological behaviour. In: Montagna W, Hu F, eds. *Advances in the Biology of the Skin*. New York: Pergamon; 1967:621-47.
54. Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969;29:705-27.
55. Reed RJ. Acral lentiginous melanoma. In: *New Concepts in Surgical Pathology of the Skin*. New York: Wiley; 1976:89-90.
56. Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. Melanoma. In: Crowson AN, Magro CM, Mihm MC, eds. *The Melanocytic Proliferations: A Comprehensive Textbook of Pigmented Lesions*. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2014:254-364.
57. Fong ZV, Tanabe KK. Comparison of melanoma guidelines in the U.S.A., Canada, Europe, Australia and New Zealand: a critical appraisal and comprehensive review. *Br J Dermatol* 2014;170:20-30.
58. Argenziano G, Zalaudek I, Hofmann-Wellenhof R, et al. Total body skin examination for skin cancer screening in patients with focused symptoms. *J Am Acad Dermatol* 2012;66:212-9.
59. Radovic-Kovacevic V, Pekmezovic T, Adanja B, Jarebinski M, Marinkovic J, Tomin R. [Survival analysis in patients with cutaneous malignant melanoma]. *Srp Arh Celok Lek* 1997;125:132-7.
60. Schwartz JL, Wang TS, Hamilton TA, Lowe L, Sondak VK, Johnson TM. Thin primary cutaneous melanomas: associated detection patterns, lesion characteristics, and patient characteristics. *Cancer* 2002;95:1562-8.

61. Waldmann A, Nolte S, Weinstock MA, et al. Skin cancer screening participation and impact on melanoma incidence in Germany--an observational study on incidence trends in regions with and without population-based screening. *Br J Cancer* 2012;106:970-4.
62. Katalinic A, Eisemann N, Waldmann A. Skin Cancer Screening in Germany. Documenting Melanoma Incidence and Mortality From 2008 to 2013. *Dtsch Arztebl Int* 2015;112:629-34.
63. Bong JL, Herd RM, Hunter JA. Incisional biopsy and melanoma prognosis. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:690-4.
64. Martin RC, 2nd, Scoggins CR, Ross MI, et al. Is incisional biopsy of melanoma harmful? *Am J Surg* 2005;190:913-7.
65. AJCC. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed: Springer; 2017.
66. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009;27:6199-206.
67. Allen AC, Spitz S. Malignant melanoma; a clinicopathological analysis of the criteria for diagnosis and prognosis. *Cancer* 1953;6:1-45.
68. Lane N, Lattes R, Malm J. Clinicopathological correlations in a series of 117 malignant melanomas of the skin of adults. *Cancer* 1958;11:1025-43.
69. Petersen NC, Bodenham DC, Lloyd OC. Malignant melanomas of the skin. A study of the origin, development, aetiology, spread, treatment, and prognosis. I. *Br J Plast Surg* 1962;15:49-94.
70. Mehnert JH, Heard JL. Staging of Malignant Melanomas by Depth of Invasion; a Proposed Index to Prognosis. *Am J Surg* 1965;110:168-76.
71. Trapl J, Palecek L, Ebel J, Kucera M. Tentative new classification of melanoma of the skin. *Acta Derm Venereol* 1966;46:443-6.
72. Dickson PV, Gershenwald JE. Staging and prognosis of cutaneous melanoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2011;20:1-17.
73. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172:902-8.
74. Thompson JF, Soong SJ, Balch CM, et al. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol* 2011;29:2199-205.
75. Buzaid AC, Ross MI, Balch CM, et al. Critical analysis of the current American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system. *J Clin Oncol* 1997;15:1039-51.
76. Kim SH, Garcia C, Rodriguez J, Coit DG. Prognosis of thick cutaneous melanoma. *J Am Coll Surg* 1999;188:241-7.

77. Balch CM, Soong S, Ross MI, et al. Long-term results of a multi-institutional randomized trial comparing prognostic factors and surgical results for intermediate thickness melanomas (1.0 to 4.0 mm). Intergroup Melanoma Surgical Trial. *Ann Surg Oncol* 2000;7:87-97.
78. Callender GG, Egger ME, Burton AL, et al. Prognostic implications of anatomic location of primary cutaneous melanoma of 1 mm or thicker. *Am J Surg* 2011;202:659-64; discussion 64-5.
79. Day CL, Jr., Harrist TJ, Gorstein F, et al. Malignant melanoma. Prognostic significance of "microscopic satellites" in the reticular dermis and subcutaneous fat. *Ann Surg* 1981;194:108-12.
80. Harrist TJ, Rigel DS, Day CL, Jr., et al. "Microscopic satellites" are more highly associated with regional lymph node metastases than is primary melanoma thickness. *Cancer* 1984;53:2183-7.
81. Leon P, Daly JM, Synnestvedt M, Schultz DJ, Elder DE, Clark WH, Jr. The prognostic implications of microscopic satellites in patients with clinical stage I melanoma. *Arch Surg* 1991;126:1461-8.
82. Mraz-Gernhard S, Sagebiel RW, Kashani-Sabet M, Miller JR, 3rd, Leong SP. Prediction of sentinel lymph node micrometastasis by histological features in primary cutaneous malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1998;134:983-7.
83. Grotz TE, Vaince F, Hieken TJ. Tumor-infiltrating lymphocyte response in cutaneous melanoma in the elderly predicts clinical outcomes. *Melanoma Res* 2013;23:132-7.
84. Ronan SG, Eng AM, Briele HA, Shioura NN, Das Gupta TK. Thin malignant melanomas with regression and metastases. *Arch Dermatol* 1987;123:1326-30.
85. Byers HR, Bhawan J. Pathologic parameters in the diagnosis and prognosis of primary cutaneous melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998;12:717-35.
86. Luke JJ, Schwartz GK. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin Dermatol* 2013;31:290-7.
87. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:711-23.
88. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, et al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 2015;33:1889-94.
89. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011;364:2517-26.
90. Ascierto PA, Del Vecchio M, Robert C, et al. Ipilimumab 10 mg/kg versus ipilimumab 3 mg/kg in patients with unresectable or metastatic melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017;18:611-22.



91. Larkin J, Hodi FS, Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 2015;373:1270-1.
92. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015;372:2006-17.
93. Schachter J, Ribas A, Long GV, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet* 2017;390:1853-62.
94. Luo C, Shen J. Research progress in advanced melanoma. *Cancer Lett* 2017;397:120-6.
95. Robert C, Long GV, Brady B, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 2015;372:320-30.
96. Larkin J, Minor D, D'Angelo S, et al. Overall Survival in Patients With Advanced Melanoma Who Received Nivolumab Versus Investigator's Choice Chemotherapy in CheckMate 037: A Randomized, Controlled, Open-Label Phase III Trial. *J Clin Oncol* 2018;36:383-90.
97. Robert C, Schachter J, Long GV, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2015;372:2521-32.
98. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 2015;373:23-34.
99. Jordan EJ, Kelly CM. Vemurafenib for the treatment of melanoma. *Expert Opin Pharmacother* 2012;13:2533-43.
100. Ascierto PA, Minor D, Ribas A, et al. Phase II trial (BREAK-2) of the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2013;31:3205-11.
101. Falchook GS, Lewis KD, Infante JR, et al. Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol* 2012;13:782-9.
102. Ribas A, Gonzalez R, Pavlick A, et al. Combination of vemurafenib and cobimetinib in patients with advanced BRAF(V600)-mutated melanoma: a phase 1b study. *Lancet Oncol* 2014;15:954-65.
103. Larkin J, Ascierto PA, Dreno B, et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 2014;371:1867-76.
104. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 2015;386:444-51.
105. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* 2015;372:30-9.

106. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, et al. Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2018;19:603-15.
107. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, et al. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N Engl J Med* 2014;371:1877-88.
108. Davies MA, Saiag P, Robert C, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAF(V600)-mutant melanoma brain metastases (COMBI-MB): a multicentre, multicohort, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017;18:863-73.
109. Dummer R, Schadendorf D, Ascierto PA, et al. Binimetinib versus dacarbazine in patients with advanced NRAS-mutant melanoma (NEMO): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017;18:435-45.
110. Guo J, Carvajal RD, Dummer R, et al. Efficacy and safety of nilotinib in patients with KIT-mutated metastatic or inoperable melanoma: final results from the global, single-arm, phase II TEAM trial. *Ann Oncol* 2017;28:1380-7.
111. Napolitano S, Brancaccio G, Argenziano G, et al. It is finally time for adjuvant therapy in melanoma. *Cancer Treat Rev* 2018;69:101-11.
112. Spangle JM, Roberts TM. Epigenetic regulation of RTK signaling. *J Mol Med (Berl)* 2017;95:791-8.
113. Roesler R, de Farias CB, Abujamra AL, Brunetto AL, Schwartzmann G. BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. *Expert Rev Anticancer Ther*;11:1473-5.
114. Bothwell M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling. *F1000Res* 2016;5.
115. Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2014;13:397-406.
116. NTRK2 neurotrophic receptor tyrosine kinase 2 [homo sapiens (human)]. 2017. (Accessed 2017, at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4915#gene-expression>.)
117. BDNF brain derived neurotrophic factor [Homo sapiens (human)]. 2017. (Accessed at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/627>.)
118. Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett* 2001;169:107-14.
119. Zhu ZW, Friess H, Wang L, Di Mola FF, Zimmermann A, Buchler MW. Down-regulation of nerve growth factor in poorly differentiated and advanced human esophageal cancer. *Anticancer Res* 2000;20:125-32.
120. Davidson B, Reich R, Lazarovici P, et al. Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:2248-59.

121. Sclabas GM, Fujioka S, Schmidt C, et al. Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005;11:440-9.
122. Huang YT, Lai PC, Wu CC, et al. BDNF mediated TrkB activation is a survival signal for transitional cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2010;36:1469-76.
123. Schmidt AL, de Farias CB, Abujamra AL, et al. BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci* 2010;40:303-10.
124. Brunetto de Farias C, Rosemberg DB, Heinen TE, et al. BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology* 2010;79:430-9.
125. Patani N, Jiang WG, Mokbel K. Brain-derived neurotrophic factor expression predicts adverse pathological & clinical outcomes in human breast cancer. *Cancer Cell Int* 2011;11:23.
126. Gotz R, Sendtner M. Cooperation of tyrosine kinase receptor TrkB and epidermal growth factor receptor signaling enhances migration and dispersal of lung tumor cells. *PLoS One* 2014;9:e100944.
127. Thomaz A, Jaeger M, Buendia M, et al. BDNF/TrkB Signaling as a Potential Novel Target in Pediatric Brain Tumors: Anticancer Activity of Selective TrkB Inhibition in Medulloblastoma Cells. *J Mol Neurosci* 2016;59:326-33.
128. Marchetti D, Nicolson GL. Human melanoma cell invasion: selected neurotrophin enhancement of invasion and heparanase activity. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1997;2:99-105.
129. Portich JP, Gil MS, Dos Santos RP, et al. Low brain-derived neurotrophic factor levels are associated with active disease and poor prognosis in childhood acute leukemia. *Cancer Biomark* 2016;17:347-52.
130. Heinen TE, Dos Santos RP, da Rocha A, et al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget* 2016;7:34860-80.
131. de Souza DR, Sanabani SS, de Souza AC, Filho Odone V, Epelman S, Bendit I. Prognostic impact of MYCN, DDX1, TrkA, and TrkC gene transcripts expression in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56:749-56.
132. Hua Z, Gu X, Dong Y, et al. PI3K and MAPK pathways mediate the BDNF/TrkB-increased metastasis in neuroblastoma. *Tumour Biol* 2016.
133. Thiele CJ, Li Z, McKee AE. On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res* 2009;15:5962-7.
134. Desmet CJ, Peeper DS. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci* 2006;63:755-9.
135. Nicolson GL. Metastatic tumor cell interactions with endothelium, basement membrane and tissue. *Curr Opin Cell Biol* 1989;1:1009-19.

136. Nakajima M, Irimura T, Nicolson GL. Tumor metastasis-associated heparanase (heparan sulfate endoglycosidase) activity in human melanoma cells. *Cancer Lett* 1986;31:277-83.
137. Marchetti D, McQuillan DJ, Spohn WC, Carson DD, Nicolson GL. Neurotrophin stimulation of human melanoma cell invasion: selected enhancement of heparanase activity and heparanase degradation of specific heparan sulfate subpopulations. *Cancer Res* 1996;56:2856-63.
138. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991;64:327-36.
139. Nicolson GL, Nakajima M, Herrmann JL, et al. Malignant melanoma metastasis to brain: role of degradative enzymes and responses to paracrine growth factors. *J Neurooncol* 1994;18:139-49.
140. Marchetti D, Menter D, Jin L, Nakajima M, Nicolson GL. Nerve growth factor effects on human and mouse melanoma cell invasion and heparanase production. *Int J Cancer* 1993;55:692-9.
141. Chao MV. Growth factor signaling: where is the specificity? *Cell* 1992;68:995-7.
142. Bothwell M. Tissue localization of nerve growth factor and nerve growth factor receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;165:55-70.
143. Barbacid M. Nerve growth factor: a tale of two receptors. *Oncogene* 1993;8:2033-42.
144. Lamballe F, Klein R, Barbacid M. *trkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 1991;66:967-79.
145. Herlyn M, Thurin J, Balaban G, et al. Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression. *Cancer Res* 1985;45:5670-6.
146. Herrmann JL, Menter DG, Hamada J, Marchetti D, Nakajima M, Nicolson GL. Mediation of NGF-stimulated extracellular matrix invasion by the human melanoma low-affinity p75 neurotrophin receptor: melanoma p75 functions independently of *trkA*. *Mol Biol Cell* 1993;4:1205-16.
147. Easty DJ, Herlyn M, Bennett DC. Abnormal protein tyrosine kinase gene expression during melanoma progression and metastasis. *Int J Cancer* 1995;60:129-36.
148. Innominato PF, Libbrecht L, van den Oord JJ. Expression of neurotrophins and their receptors in pigment cell lesions of the skin. *J Pathol* 2001;194:95-100.
149. Xu X, Tahan SR, Pasha TL, Zhang PJ. Expression of neurotrophin receptor *Trk-C* in nevi and melanomas. *J Cutan Pathol* 2003;30:318-22.
150. Florenes VA, Maelandsmo GM, Holm R, Reich R, Lazarovici P, Davidson B. Expression of activated *TrkA* protein in melanocytic tumors: relationship to cell proliferation and clinical outcome. *Am J Clin Pathol* 2004;122:412-20.

151. Pasini L, Re A, Tebaldi T, et al. TrkA is amplified in malignant melanoma patients and induces an anti-proliferative response in cell lines. *BMC Cancer* 2015;15:777.
152. Milman T, Hu DN, McCormick SA, et al. Expression of neurotrophin receptors by retinoinvasive uveal melanoma. *Melanoma Res* 2012;22:164-8.
153. Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol*;70:304-22.
154. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2003;72:609-42.
155. Lam CT, Yang ZF, Lau CK, Tam KH, Fan ST, Poon RT. Brain-derived neurotrophic factor promotes tumorigenesis via induction of neovascularization: implication in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2011;17:3123-33.
156. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005;353:2135-47.
157. Anderson S, Bloom KJ, Vallera DU, et al. Multisite analytic performance studies of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of BRAF V600E mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens of malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136:1385-91.
158. Boursault L, Haddad V, Vergier B, et al. Tumor homogeneity between primary and metastatic sites for BRAF status in metastatic melanoma determined by immunohistochemical and molecular testing. *PLoS One* 2013;8:e70826.

## 8 ARTIGO

### **Tropomyosin-related kinase receptor and neurotrophin expression in cutaneous melanoma is associated with poor prognosis and survival**

**Luis Carlos Moreira Antunes<sup>1,2</sup>, André Cartell<sup>3</sup>, Caroline Brunetto de Farias<sup>4</sup>, Renato Marchiori Bakos<sup>1,5</sup>, Rafael Roesler<sup>4,6</sup>, Gilberto Schwartzmann<sup>1,4,7</sup>**

<sup>1</sup>Graduate Program in Medical Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Hematology and Oncology Service, Santa Maria University Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>3</sup>Department of Pathology, Porto Alegre Clinical Hospital, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup>Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Porto Alegre Clinical Hospital, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>5</sup>Department of Dermatology, Porto Alegre Clinical Hospital, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>6</sup>Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>7</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

**Correspondence to:** Luís Carlos Moreira Antunes

**Email:** [luisantunes@clinicaviversm.com.br](mailto:luisantunes@clinicaviversm.com.br)

**Abstract**

Normally, activation of tropomyosin-related kinase (TRK) receptors by neurotrophins (NTs) stimulates intracellular pathways involved in cell survival and proliferation. Dysregulation of NT/TRK signaling may affect neoplasm prognosis. Data on NT and TRK expression in melanomas are limited and it is unclear whether NT-TRK signaling pathways are involved in the origin and progression of this neoplasm. Here, we examined whether NT/TRK expression differs across different cutaneous melanoma grades and subtypes and whether it is associated with melanoma prognosis and survival. A cross-sectional study was performed in which the expression of TrkA, TrkB, nerve growth factor (NGF), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were analyzed by immunohistochemistry (IHC) of 154 melanoma samples. We investigated NT/TRK expression associations with prognostic factors for melanoma, relapse-free survival (RFS), and overall survival (OS). Of the 154 melanoma samples, 77 (55.4%) were TrkA immunopositive, 81 (58.3%) were TrkB immunopositive, 113 (81.3%) were BDNF immunopositive, and 104 (75.4%) were NGF immunopositive. We found NT/TRK expression associated strongly with several clinical prognostic factors, including tumor-node-metastasis (TNM) stage ( $p < 0.001$ ), histological subtype ( $p < 0.001$ ), and Clark level ( $p < 0.05$ ), as well as with a worse OS ( $p < 0.05$  for all, except TrkB) and RFS ( $p < 0.05$  for all). Our results show strong associations of NT/TRK expression with melanoma stage progression and a poor prognosis.

**Keywords:** Melanoma, TrkA, TrkB, Brain-Derived Neurotrophic Factor, NGF

## Introduction

Advances in the treatment of metastatic melanoma, including selective kinase inhibitors [1,2] and, more recently, immune checkpoint blockers, have prolonged patient survival times [3-6]. However, even these new therapies have limitations related to patient selection, adverse events, and resistance [7]. Thus, efforts to further elucidate melanoma biology and identify new therapeutic targets are useful for the development of novel effective treatments.

The transition of a normal melanocyte into a melanoma cell and the mechanisms by which melanoma cells then utilize the properties of melanocytes and melanocyte progenitors in their progression are not well understood [8]. Embryologically, precursor melanocytes are derived from the neural crest and then migrate to different areas in the body, such as the skin, meninges, mucous membranes, upper esophagus, and eyes, during the course of fetal development [9,10]. Melanoma may arise from any of these peripheral sites, though the most common location is by far hair follicle-bearing skin, arising from melanocytes at dermal-epidermal junctions [11].

Tropomyosin-related kinase (TRK) receptors are a family of tyrosine kinase receptors that are activated by neurotrophins (NTs), such as nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), NT-3, and NT-4 [12]. NTs have a wide variety of functions in neural and non-neural tissues, controlling the physiology in adults as well as embryonic development. Although the TRK receptors are activated preferentially by NTs, they also possess NT-independent signaling functions [13]. Normally, the primary functions of TRK receptors, including TrkA, TrkB and TrkC subtypes, include regulating neuronal growth, differentiation, and programmed cell death. However, fusion of the TRK gene with the tropomyosin gene at the locus encoding its extracellular domain results in a receptor with constitutive tyrosine kinase activity, which induces continuous cellular proliferation [14].

Previous studies have described NT stimulation in melanoma cell invasion [15] suggestive of a possible role of TrkC in early-stage progression of melanoma [16]. Additionally, it has been suggested that TrkA may mediate a trade-off between neoplastic transformation and an adaptative antiproliferative response, the latter of which has been associated with shortened survival [17]. TRK receptors can activate important intracellular signalling pathways involving receptor autophosphorylation and downstream induction of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and protein kinase B (PKB/Akt) [18].

Recently, the pan-TRK inhibitor entrectinib has attracted attention for its anti-tumor effect [19]. In the present study, we analyzed the association of TrkA, TrkB, NGF, and BDNF



expression with prognostic factors in patients with cutaneous melanoma with the aim of determining whether NT/TRK expression is associated with melanoma progression and survival. We used immunohistochemistry (IHC) to investigate NT and TRK expression across melanoma tumor-node-metastasis (TNM) stages, including metastasis samples, and also evaluated their expression in non-neoplastic skin and in nevi. We assessed overall survival (OS) and relapse-free survival (RFS) in relation to the expression of NTs and their receptors.

## **Materials and Methods**

We obtained 154 paraffin blocks of cutaneous melanoma with primary lesion and/or metastasis samples from Pathology Department archives at the hospital associated with the Federal University of the city of Santa Maria and the hospital associated with the Federal University of Rio Grande do Sul in Porto Alegre, Brazil. The study was approved by the Research Ethics Committee of both universities. All tissues were fixed in neutral buffered formalin and embedded in paraffin between September 2004 to November 2012.

The blocks included samples from 139 patients whose clinical and prognostic data (age at diagnosis, sex, treatment, progression, and survival) were obtained from medical records. RFS time was calculated from the surgical resection of the first lesion to the date of the first loco-regional or distant recurrence. OS time was estimated from the date of the first surgical resection to the date of the last follow-up or time of death regardless of cause. Patients with a diagnosis of uveal or mucosal melanoma and other serious diseases that could interfere with survival were excluded.

The diagnoses were made by expert pathologists according to the classification system of the American Joint Committee on Cancer. The number of samples evaluated from each case varied according to the size and characteristics of the lesion, ranging from 1 to 22; and the most representative sample was identified by the pathology staff and submitted to immunohistochemical evaluation. Fifteen patients with melanoma had both primary lesion and metastasis samples evaluated by IHC. We also evaluated 48 samples of normal skin or benign pigment cell lesions (13 normal skin areas, 7 solar lentigos, and 28 melanocytic nevi) from patients undergoing mammoplasty or benign cutaneous lesion excisions with no history of melanoma.

From each of the 202 paraffin blocks, 3- $\mu$ m-thick sections were mounted on organosilane-coated slides. In preparation for IHC, the slides were heated in a stove at 80 °C

for 30 minutes, dewaxed in xylol, cleared in ethyl alcohol, and then rehydrated in distilled water. Antigen recovery was performed in citrate buffer (pH 6.0) heated to 95 °C in a water bath for 20 minutes, followed by a 10-minute cooling period. Endogenous peroxidase activity was blocked with 5% hydrogen peroxide solution in methanol for 20 minutes. Protein blocking was performed with 5% skim milk powder diluted in phosphate buffered saline (PBS) for 20 minutes. The following primary antibodies (all from Santa Cruz Biotechnology) were diluted 1:50 in PBS and applied for 12 h at 4 °C: polyclonal goat anti-TrkA (sc-20539), monoclonal mouse anti-TrkB (sc-377218), polyclonal rabbit anti-BDNF (sc-20981), and polyclonal rabbit anti-NGF (sc-33602). Donkey anti-goat IgG-H&L (ab7125, Abcam) and goat anti-rabbit IgG (AP132P, Millipore) horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were applied (dilution 1:200 in PBS) for 90 minutes at room temperature. Immunoreactivity was assessed with a liquid 3,3'-diaminobenzidine substrate chromogen system (K3468, DakoCytomation). The cell nucleus was lightly contrasted with hematoxylin.

Positive immunoreactivity was defined as brown-colored precipitate in the membrane and cytoplasm (Figure 1). Such staining occurred regardless of being a pigmented or nonpigmented area of melanoma cells, and homogeneously through the thickness of tumor areas. TrkA, TrkB, and BDNF immunopositivity were classified as none, weak, moderate, or strong; we also evaluated the percentage of cells labelled (0–100%) in 5% increments (Supplementary Tables 1 and 2). Due to the relatively poorer quality of anti-NGF IHC, we identified NGF labelling as simply positive or not. Thus, clinicopathological variables are correlated only in relation to the absence or presence of the analyzed NTs and TRKs. Negative control samples exposed only to secondary antibody showed no specific staining. The pathologist who evaluated the IHC results was blind to the patients' clinical status. Lymphocytes in the tumor mass stroma or within tumor cell nests were classified as intratumoral; lymphocytes surrounding the tumor mass were classified as peritumoral. Tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) grade was scored as absent, nonbrisk, or brisk [20,21]. Brisk and nonbrisk grades were recorded as present.

### **Statistical analysis**

All statistical analyses were completed in SPSS version 18.0. Chi-square tests were performed to evaluate associations between categorical variables. Normality analysis was performed with the Shapiro-Wilk test. Mann-Whitney U or Kruskal-Wallis tests were used for nonparametric comparisons. RFS and OS were estimated with the Kaplan-Meier method and

the log-rank test. Hazard ratios (HRs) from Cox regression analysis were used to determine whether OS was associated with the expression of NTs or TRK receptors. For all comparisons,  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### Basic clinicopathological features

The 139 patients with melanoma whose biopsies were analyzed (Tables 1 and 2) included 69 (49.6%) males and 70 (50.4%) females, with a median age of 57.95 years (range, 15–88 years). TrkA and TrkB immunopositivity were observed in 77 (55.4%) and 81 (58.3%) cases, respectively. BDNF immunopositivity was found in 113 (81.3%) cases. Because one patient did not have enough material to perform NGF IHC, 138 patients were evaluated for NGF expression, of which 104 (75.4%) were immunopositive for NGF.

Of the 77 TrkA immunopositive cases, 69 (89.6%) were also immunopositive for the TrkA-binding NT NGF. Of the remaining 61 cases negative for TrkA, 26 (42.6%) were also negative for NGF. Of the 81 TrkB immunopositive cases, 75 (92.6%) were also immunopositive for BDNF, while 20 of the 58 cases (34.5%) that were negative for TrkB were negative for BDNF.

### TrkA and clinicopathological factors of Melanoma

TrkA immunopositivity was not significantly related to age ( $p = 0.297$ ), gender ( $p = 0.437$ ), primary neoplasm location ( $p = 0.208$ ), ulceration ( $p = 0.672$ ), intratumoral TILs ( $p = 0.553$ ), or peritumoral TILs ( $p = 0.334$ ). TrkA expression in the primary lesion and metastasis samples were concordant in 73.3% (11/15) of the evaluated patients.

TNM stage 0 samples showed a significant association with TrkA expression negativity, whereas TNM stage IV samples were associated with TrkA immunopositivity ( $p < 0.001$ ). Clark level I was associated with TrkA expression negativity, whereas Clark level V was associated with TrkA immunopositivity ( $p = 0.004$ ). A low mitotic index was associated with the absence of TrkA expression, while an index greater than 5/10 high-power fields was associated with TrkA immunopositivity ( $p = 0.012$ ). We also observed a statistical trend toward an association between tumor thickness and TrkA expression ( $p = 0.051$ ). Lentigo maligna (LM), *in situ* melanoma, and lentigo maligna melanoma (LMM) were associated with TrkA

expression negativity, whereas acral lentiginous melanoma (ALM) and nodular melanoma (NM) were associated with TrkA immunopositivity ( $p < 0.001$ ).

### **TrkB and clinicopathological factors of melanoma**

TrkB expression was not related to age ( $p = 0.784$ ), gender ( $p = 0.807$ ), or the location of the primary lesion ( $p = 0.181$ ). One of the 15 patients who had two samples analyzed had an insufficient metastatic sample for analysis; among the remaining 14 patients' metastatic samples, 8 (57.1%) had TrkB expression.

Similar to our findings with TrkA expression, an association was identified between TNM stage 0 and TrkB expression negativity as well as between TNM stage IV and TrkB immunopositivity ( $p < 0.001$ ). Melanomas with Clark level I samples were associated with TrkB expression negativity, whereas Clark level IV samples were associated with TrkB immunopositivity ( $p = 0.004$ ). TrkB expression was not related to tumor thickness, mitotic index, ulceration, or the presence of intratumoral or peritumoral TILs ( $p = 0.532$ ,  $p = 0.093$ ,  $p = 0.756$ ,  $p = 0.891$  and  $p = 0.602$ , respectively). Regarding histological subtype, LM was associated with TrkB expression negativity, whereas superficial spreading melanoma (SSM), NM, and ALM were associated with TrkB immunopositivity ( $p < 0.001$ ).

### **NGF and clinicopathological factors of melanoma**

NGF expression was not significantly related to age ( $p = 0.433$ ), gender ( $p = 0.373$ ), location of the primary lesion ( $p = 0.288$ ), ulceration ( $p = 0.466$ ), intratumoral TILS ( $p > 0.999$ ), or peritumoral TILS ( $p = 0.272$ ). NGF expression in the primary lesion and metastasis samples showed concordance in 60% (9/15) of the cases.

An absence of NGF expression was associated with TNM stage 0 grading, whereas NGF immunopositivity was associated with TNM stage IV grading ( $p < 0.001$ ). Regarding depth, Clark level I was associated with no expression of NGF, and Clark level IV was associated with NGF immunopositivity ( $p = 0.023$ ). Tumor thickness did not correlate with NGF positivity ( $p = 0.095$ ). A higher mitotic index was associated with NGF positivity, whereas an absence of NGF expression was associated with a low mitotic index ( $p = 0.041$ ). LM and LMM histologies were associated with an absence of NGF expression, whereas SSM and ALM subtypes were associated with NGF immunopositivity ( $p < 0.001$ ).

### **BDNF and clinicopathological factors of melanoma**

BDNF expression was not related to age ( $p = 0.521$ ), gender ( $p = 0.860$ ), location of the primary tumor ( $p = 0.545$ ), or the presence of intratumoral ( $p = 0.203$ ) or peritumoral ( $p = 0.963$ ) TILs. A significant association was found between BDNF expression negativity and TNM stage 0, as well as between BDNF immunopositivity and TNM stage IV ( $p < 0.001$ ). Regarding depth of invasiveness, Clark level I was associated with BDNF expression negativity, whereas Clark level IV was associated with BDNF immunopositivity ( $p < 0.001$ ). Moreover, tumor thickness (in mm) was found to associate directly with BDNF expression negativity ( $p = 0.002$ ). Ulceration was associated with BDNF expression; conversely, an absence of ulceration was associated with non-expression of BDNF ( $p = 0.036$ ). *In situ* and LM histological subtypes showed a correlation with BDNF expression negativity, whereas melanoma metastases were associated with BDNF immunopositivity ( $p < 0.001$ ). For the 14 patients for which there were sufficient primary tumor and metastasis samples, all specimens, both primary and metastatic, were BDNF immunopositive. The metastasis biopsy sample for a 15<sup>th</sup> patient was insufficient for analysis.

### **NT and TRK expression in normal skin and benign pigmented lesions**

As reported in Table 3, all normal skin and solar lentigo samples showed no immunoreactivity for any of the examined NTs and TRK receptors. Of the 28 nevi, 26 (92.9%) were BDNF immunopositive, 12 (42.9%) were NGF immunopositive, 10 (35.7%) were TrkB immunopositive, and 3 (10.7%) were TrkA immunopositive. TrkA (10.7% vs. 55.4%,  $p < 0.001$ ), TrkB (35.7% vs. 58.3%,  $p = 0.048$ ), and NGF (42.9% vs. 75.4,  $p = 0.001$ ) immunolabeling were all significantly more frequent in nevi than in melanomas. BDNF expression was similarly common among these two tissue types (92.9% vs. 81.3%,  $p = 0.172$ ).

### **Survival analysis**

A total of 139 patients diagnosed with cutaneous melanoma or recurrence from 2004 to 2012 were included in the survival analysis, which took into account the original date of diagnosis, including dates prior to the aforementioned period for patients with diagnosed recurrence between 2004 and 2012. In Kaplan-Meier analysis (Figures 2 and 3), OS and RFS

were found to be inversely related to expression of TrkA ( $p = 0.025$  and  $p = 0.002$ , respectively), TrkB ( $p = 0.174$  and  $p = 0.005$ , respectively), BDNF ( $p = 0.002$  and  $p = 0.001$ , respectively), and NGF ( $p = 0.030$  and  $p = 0.007$ , respectively). The absence of NT and TRK expression, with the exception of TrkB (not significant) were associated with a reduced mortality risk (Table 4).

## Discussion

To the best of our knowledge, the present study was the first to examine a possible association between NT/TRK expression and clinical stage parameters of melanoma. We found that TNM stage 0 samples showed a strong tendency to not express NTs or TRK receptors, whereas TNM stage IV samples showed a strong association with NT and TRK immunopositivity. With respect to Clark levels, we identified a strong association of an absence of immunoreactivity for NTs and TRKs with level I grading, whereas TRK positivity was found to be strongly associated with level V grading and NGF, TrkB, and BDNF expression were all associated with level IV grading. Thicker and ulcerated tumors showed a significant propensity for BDNF expression, as well as non-significant trends for TrkA, NGF, and TrkB expression. Histological diagnoses of NM, ALM, and SSM were associated with expression of NTs and TRKs, while *in situ* melanoma, LM, and LMM were associated with an absence of NT/TRK expression.

These findings are in line with those published by Florenes et al. [17], who reported a significant variation of TrkA expression, with the lowest expression being observed in thinner lesions, as well as a significant association of TrkA expression with ulceration and with the NM subtype. Furthermore, our observation of a strong association between melanoma metastasis and BDNF immunopositivity is consistent with Innominato *et al.*'s [38] report of more frequent expression of BDNF and TrkB in metastatic lesions, compared to primary lesions, and further supports the hypothesis that BDNF activation of TrkB receptor signaling promotes neuroblastoma metastasis, via PI3K/Akt/mTOR and MAPK pathways [39]. Regarding mitotic index, we found that a higher index was associated with the presence of TrkA and NGF immunoreactivity. A similar nonsignificant trend was observed for TrkB and BDNF. Although normal skin samples and solar lentigo lesions were negative for NT and TRK expression, we found that melanocytic nevi presented considerable NT and TRK expression. This positivity in nevi might reflect an adaptive anti-proliferative response involving MAPK activation [18], which may trigger an oncogene-driven senescence process involving NTs/TRKs, similar to that described for B-Raf expression in nevi [40]. This senescence may

take some time to occur, allowing an initial proliferation phase that results in a benign tumor [41,42]. Negligible or absent NT/TRK expression in early-stage melanomas could reflect a failure of this mechanism to stop premalignant growth [42]. Activation of these pathways in late-stage melanoma may be unable to cause cancer cell senescence due to the accumulation of other oncogenic mutations [42]. It remains unclear whether high expression levels of NTs and TRKs in advanced cancers indicate a poor prognosis or reflect an adaptive anti-proliferative process.

We found significant differences in RFS and OS in relation to the expression of TRKs and NTs (except TrkB for OS). The number of patients included did not allow an adjusted survival analysis for different prognostic factors or treatment types. However, none of the standard-of-care treatments that patients had access to during this time period were found to improve survival in a prospectively randomized, well-controlled phase III trial [43]. Our study evaluated patients who, generally speaking, did not have access to new therapies (e.g. targeted agents and new immunotherapies) or new predictive tests of response (e.g. *BRAF* mutation screening and programmed death-ligand 1 protein expression) [7]. Larger studies are needed to examine the relationships of NT and TRK expression levels with responsiveness to new therapies and predictive biomarkers [44].

Melanocytes share with the nervous system a neuroectodermal origin, as well as the expression of NTs and NT receptors [22-24]. The involvement of NTs and TRKs in oncogenesis has been investigated in several types of tumors [25-33], and NT activation of TRK receptors has been shown to be involved in early-stage malignancy development, metastasis, and resistance to treatment [34-37]. In an IHC study of 15 cutaneous melanoma, 12 melanoma metastasis, and 16 benign pigment cell lesion samples, Innominato *et al.* [38] found that expression of NGF, BDNF, NT-3, and their receptors (p75, TrkB, and TrkC) was more frequent in cutaneous melanoma and metastasis samples than in benign lesions or normal skin [38]. Interestingly, Xu *et al.* [16] found TrkC expression in 30% of benign compound nevi (3/10) and 62% of melanomas (39/63), with the frequency of TrkC expression increasing with the progression from *in situ* (58%) to papillary dermal invasive (91%) lesions, and then decreasing with deeper dermis (57%) and metastatic progression (31%). In another IHC study, Florenes *et al.* [17] found TrkA expression in 54.6% of 152 primary lesions and 30% of 64 metastases, with an association of TrkA expression with NM subtype, tumor thickness, and the presence of ulceration, as well a lower OS among patients with tumors expressing activated TrkA.

Pasini *et al.* [18] analyzed 31 cutaneous melanoma samples by array comparative hybridization and identified amplification of the 1q23.1 genomic locus, a melanoma-

progression hotspot candidate locus that includes the TrkA encoding gene. The analysis was validated by genomic quantitative polymerase chain reaction, which confirmed TrkA expression in half of 64 melanomas with an association between TrkA expression and a worse prognosis [18]. Furthermore, they used induced activation of NGF-TrkA receptor signaling to induce a cell proliferation suppression phenotype in human melanoma cells *in vitro* characterized by inhibited cell division and pronounced intracellular vacuolization [18]. These events were triggered by MAPK activity, suggesting that the NGF-TrkA-MAPK pathway may mediate a trade-off between neoplastic transformation and an adaptive anti-proliferative response [18].

Recently, the TRK protein inhibitors entrectinib (ALKA-372-001 and STARTAK-1) [19] and larotrectinb (NCT02122913, NCT02637687 and NCT02576431) [45] were shown to be well tolerated and to exhibit marked and durable antitumor activity in patients with TRK fusion-positive cancer, regardless of patient age or tumor type. Recurrent TRK fusions involving the *NTRK1/2/3* genes (which encode TrkA/B/C proteins, respectively) lead to overexpression of the chimeric protein, resulting in constitutive downstream signaling [45]. Our study suggests a strong role for the NTs NGF and BDNF, in addition to TRKs, in melanoma progression, likely through the activation of TRK receptors. Thus, increased NT expression should be investigated as a possible mechanism of resistance to multikinase inhibitors.

If confirmed to be safe and efficacious, the emergence of pan-TRK inhibitors as a malignant melanoma therapy strategy would expand treatment options for this patient population substantially. The choice of melanoma treatment should take into account patient-specific features, such as biomarkers, comorbidities, and biochemical and clinical parameters of melanoma kinetics. In summary, our results show that NT/TRK expression is related to melanoma progression and worse survival. Future studies are needed to clarify whether elevated NT/TRK expression is predictive of aggressive phenotypes, whether NT/TRK tumor characterization is useful for prognostication, and whether NT/TRK expression, perhaps in some stages, may represent an adaptive response, as suggested by their increased expression in nevi.

## **Acknowledgments**

We thank Luciano Santos Pinto Guimarães for his assistance with the clinical data analysis.



## References

1. Ascierto PA, McArthur GA, Dreno B, Atkinson V, Liskay G, Di Giacomo AM, *et al.* Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 1248-1260.
2. Long GV, Flaherty KT, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, *et al.* Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann Oncol* 2017; 28: 1631-1639.
3. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob JJ, Cowey CL, *et al.* Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2017; 377: 1345-1356.
4. Schachter J, Ribas A, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, *et al.* Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet* 2017; 390: 1853-1862.
5. Robert C, Ribas A, Hamid O, Daud A, Wolchok JD, Joshua AM, *et al.* Durable Complete Response After Discontinuation of Pembrolizumab in Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 2017: JCO2017756270.
6. Ugurel S, Rohmel J, Ascierto PA, Flaherty KT, Grob JJ, Hauschild A, *et al.* Survival of patients with advanced metastatic melanoma: the impact of novel therapies-update 2017. *Eur J Cancer* 2017; 83: 247-257.
7. Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14: 463-482.
8. Uong A, Zon LI Melanocytes in development and cancer. *J Cell Physiol* 2010; 222: 38-41.
9. Ali Z, Yousaf N, Larkin J Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC Suppl* 2013; 11: 81-91.
10. Sullivan RJ, Fisher DE Understanding the biology of melanoma and therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin North Am* 2014; 28: 437-453.

11. Chang AE, Karnell LH, Menck HR The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer* 1998; 83: 1664-1678.
12. Huang EJ, Reichardt LF Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2003; 72: 609-642.
13. Bothwell M Recent advances in understanding neurotrophin signaling. *F1000Res* 2016; 5.
14. Nakagawara A Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett* 2001; 169: 107-114.
15. Marchetti D, McQuillan DJ, Spohn WC, Carson DD, Nicolson GL Neurotrophin stimulation of human melanoma cell invasion: selected enhancement of heparanase activity and heparanase degradation of specific heparan sulfate subpopulations. *Cancer Res* 1996; 56: 2856-2863.
16. Xu X, Tahan SR, Pasha TL, Zhang PJ Expression of neurotrophin receptor Trk-C in nevi and melanomas. *J Cutan Pathol* 2003; 30: 318-322.
17. Florenes VA, Maelandsmo GM, Holm R, Reich R, Lazarovici P, Davidson B Expression of activated TrkA protein in melanocytic tumors: relationship to cell proliferation and clinical outcome. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 412-420.
18. Pasini L, Re A, Tebaldi T, Ricci G, Boi S, Adami V, *et al.* TrkA is amplified in malignant melanoma patients and induces an anti-proliferative response in cell lines. *BMC Cancer* 2015; 15: 777.
19. Drilon A, Siena S, Ou SI, Patel M, Ahn MJ, Lee J, *et al.* Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov* 2017; 7: 400-409.
20. Thomas NE, Busam KJ, From L, Krickler A, Armstrong BK, Anton-Culver H, *et al.* Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. *J Clin Oncol* 2013; 31: 4252-4259.

21. Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry Dt, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, *et al.* Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1893-1904.
22. Herlyn M, Thurin J, Balaban G, Bannicelli JL, Herlyn D, Elder DE, *et al.* Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression. *Cancer Res* 1985; 45: 5670-5676.
23. Marconi A, Panza MC, Bonnet-Duquennoy M, Lazou K, Kurfurst R, Truzzi F, *et al.* Expression and function of neurotrophins and their receptors in human melanocytes. *Int J Cosmet Sci* 2006; 28: 255-261.
24. Truzzi F, Marconi A, Lotti R, Dallaglio K, French LE, Hempstead BL, *et al.* Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2031-2040.
25. Zhu ZW, Friess H, Wang L, Di Mola FF, Zimmermann A, Buchler MW Down-regulation of nerve growth factor in poorly differentiated and advanced human esophageal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 125-132.
26. Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Nesland JM, Skrede M, Risberg B, *et al.* Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2248-2259.
27. Scwabas GM, Fujioka S, Schmidt C, Li Z, Frederick WA, Yang W, *et al.* Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 440-449.
28. Huang YT, Lai PC, Wu CC, Hsu SH, Cheng CC, Lan YF, *et al.* BDNF mediated TrkB activation is a survival signal for transitional cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2010; 36: 1469-1476.
29. Schmidt AL, de Farias CB, Abujamra AL, Kapczinski F, Schwartzmann G, Brunetto AL, *et al.* BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci* 2010; 40: 303-310.
30. Brunetto de Farias C, Rosemberg DB, Heinen TE, Koehler-Santos P, Abujamra AL, Kapczinski F, *et al.* BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology* 2010; 79: 430-439.

31. Patani N, Jiang WG, Mokbel K Brain-derived neurotrophic factor expression predicts adverse pathological & clinical outcomes in human breast cancer. *Cancer Cell Int* 2011; 11: 23.
32. Gotz R, Sendtner M Cooperation of tyrosine kinase receptor TrkB and epidermal growth factor receptor signaling enhances migration and dispersal of lung tumor cells. *PLoS One* 2014; 9: e100944.
33. Thomaz A, Jaeger M, Buendia M, Bambini-Junior V, Gregianin LJ, Brunetto AL, *et al.* BDNF/TrkB Signaling as a Potential Novel Target in Pediatric Brain Tumors: Anticancer Activity of Selective TrkB Inhibition in Medulloblastoma Cells. *J Mol Neurosci* 2016; 59: 326-333.
34. Marchetti D, Nicolson GL Human melanoma cell invasion: selected neurotrophin enhancement of invasion and heparanase activity. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1997; 2: 99-105.
35. Roesler R, de Farias CB, Abujamra AL, Brunetto AL, Schwartzmann G BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. *Expert Rev Anticancer Ther* 2011; 11: 1473-1475.
36. Portich JP, Gil MS, Dos Santos RP, Goulart BK, Ferreira MB, Loss JF, *et al.* Low brain-derived neurotrophic factor levels are associated with active disease and poor prognosis in childhood acute leukemia. *Cancer Biomark* 2016; 17: 347-352.
37. Heinen TE, Dos Santos RP, da Rocha A, Dos Santos MP, Lopez PL, Silva Filho MA, *et al.* Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget* 2016; 7: 34860-34880.
38. Innominato PF, Libbrecht L, van den Oord JJ Expression of neurotrophins and their receptors in pigment cell lesions of the skin. *J Pathol* 2001; 194: 95-100.
39. Hua Z, Gu X, Dong Y, Tan F, Liu Z, Thiele CJ, *et al.* PI3K and MAPK pathways mediate the BDNF/TrkB-increased metastasis in neuroblastoma. *Tumour Biol* 2016.
40. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005; 436: 720-724.
41. Land H, Parada LF, Weinberg RA Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 1983; 304: 596-602.

42. Mooi WJ, Peeper DS Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 1037-1046.
43. Luke JJ, Schwartz GK Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin Dermatol* 2013; 31: 290-297.
44. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol* 2016; 17: e542-e551.
45. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, *et al.* Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med* 2018; 378: 731-739.

Table 1 Clinicopathological characteristics of 139 patients with melanoma according to TRK and NT expression.

Variable	No. cases	TrkA (%)		TrkB (%)		NGF (%)*		BDNF (%)	
		Negative (N = 62)	Positive (N = 77)	Negative (N = 58)	Positive (N = 81)	Negative (N = 34)	Positive (N = 104)	Negative (N = 26)	Positive (N = 113)
Age, years									
<60	75	37 (59.7)	38 (49.4)	30 (51.7)	45 (55.6)	16 (47.1)	59 (56.7)	16 (61.5)	59 (52.2)
≥60	64*	25 (40.3)	39 (50.6)	28 (48.3)	36 (44.4)	18 (52.9)	45 (43.3)	10 (38.5)	54 (47.8)
			p = 0.297		p = 0.784		p = 0.433		p = 0.521
Gender									
Male	69*	28 (45.2)	41 (53.2)	30 (51.7)	39 (48.1)	14 (41.2)	54 (51.9)	12 (46.2)	57 (50.4)
Female	70	34 (54.8)	36 (46.8)	28 (48.3)	42 (51.9)	20 (58.8)	50 (48.1)	14 (53.8)	56 (49.6)
			p = 0.437		p = 0.807		p = 0.373		p = 0.860
Localization									
Head and neck	36*	15 (24.2)	21 (27.3)	19 (32.8)	17 (21.0)	12 (35.3)	23 (22.1)	7 (26.9)	29 (25.7)
Trunk	47	27 (43.5)	20 (26.0)	21 (36.2)	26 (32.1)	12 (35.3)	35 (33.7)	10 (38.5)	37 (32.7)
Upper extremity	20	8 (12.9)	12 (15.6)	8 (13.8)	12 (14.8)	2 (5.9)	18 (17.3)	5 (19.2)	15 (13.3)
Lower extremity	27	10 (16.1)	17 (22.1)	6 (10.3)	21 (25.9)	5 (14.7)	22 (21.2)	4 (15.4)	23 (20.4)
Unknown	9	2 (3.2)	7 (9.1)	4 (6.9)	5 (6.2)	3 (8.8)	6 (5.8)	0 (0.0)	9 (8.0)
			p = 0.208		p = 0.181		p = 0.288		p = 0.545
TNM stage									
0	29	<b>24 (38.7)</b>	5 (6.5)	<b>23 (39.7)</b>	6 (7.4)	<b>16 (47.1)</b>	13 (12.5)	<b>18 (69.2)</b>	11 (9.7)
I (IA, IB)	20	10 (16.1)	10 (13.0)	6 (10.3)	14 (17.3)	6 (17.6)	14 (13.5)	4 (15.4)	16 (14.2)
II (IIA, IIB, IIC)	13	5 (8.1)	8 (10.4)	4 (6.9)	9 (11.1)	1 (2.9)	12 (11.5)	0 (0.0)	13 (11.5)
III	17*	6 (9.7)	11 (14.3)	5 (8.6)	12 (14.8)	5 (14.7)	11 (10.6)	3 (11.5)	14 (12.4)
IV	60	17 (27.4)	<b>43 (55.8)</b>	20 (34.5)	40 (49.4)	6 (17.6)	<b>54 (51.9)</b>	1 (3.8)	<b>59 (52.2)</b>
			p < 0.001		p < 0.001		P < 0.001		p < 0.001

\*Metastatic sample missing from 1 case for NGF analysis. Significant associations are highlighted in bold text (adjusted residual &gt; 1.96).

Table 2 Histopathology of melanomas from 139 patients according to TRK and NT expression.

Variable	No. cases	TrkA (%)		TrkB (%)		NGF (%)*		BDNF (%)	
		Negative (N = 62)	Positive (N = 77)	Negative (N = 58)	Positive (N = 81)	Negative (N = 34)	Positive (N = 104)	Negative (N = 26)	Positive (N = 113)
Histology									
<i>In situ</i>	16	<b>11 (17.7)</b>	5 (6.5)	10 (17.2)	6 (7.4)	7 (20.6)	9 (8.7)	<b>10(38.5)</b>	6 (5.3)
SSM	42	16 (25.8)	26 (33.8)	12 (20.7)	<b>30 (37.0)</b>	4 (11.8)	<b>38(36.5)</b>	4 (15.4)	38 (33.6)
NM	22	5 (8.1)	<b>17 (22.1)</b>	5 (8.6)	<b>17 (21.0)</b>	5 (14.7)	17 (16.3)	1 (3.8)	21 (18.6)
ALM	11	1 (1.6)	<b>10 (13.0)</b>	1 (1.7)	<b>10 (12.3)</b>	0 (0.0)	<b>11(10.6)</b>	0 (0.0)	11 (9.7)
LM	13	<b>11 (17.7)</b>	2 (2.6)	<b>12 (20.7)</b>	1 (1.2)	<b>8 (23.5)</b>	5 (4.8)	<b>7 (26.9)</b>	6 (5.3)
LMM	6	<b>5 (8.1)</b>	1 (1.3)	4 (6.9)	2 (2.5)	<b>4 (11.8)</b>	1 (1.0)	2 (7.7)	4 (3.5)
DM	1	1 (1.6)	0 (0.0)	1 (1.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.9)
NOS	8	5 (8.1)	3 (3.9)	4 (6.9)	4 (4.9)	1 (2.9)	7 (6.7)	2 (7.7)	6 (5.3)
MM	20	7 (11.3)	<i>13 (16.9)</i>	9 (15.5)	11 (13.6)	5 (14.7)	15 (14.4)	0 (0.0)	<b>20 (17.7)</b>
			p < 0.001		p < 0.001		p < 0.001		p < 0.001
Clark level									
I	12	<b>8 (22.2)</b>	4 (7.0)	<b>9 (29.0)</b>	3 (4.8)	<b>6 (33.3)</b>	6 (8.1)	<b>8 (50.0)</b>	4 (5.2)
II	17	10 (27.8)	7 (12.3)	8 (25.8)	9 (14.5)	5 (27.8)	12 (16.2)	3 (18.8)	14 (18.2)
III	20*	9 (25.0)	11 (19.3)	6 (19.4)	14 (22.6)	3 (16.7)	16 (21.6)	5 (31.3)	15 (19.5)
IV	34	9 (25.0)	25 (43.9)	6 (19.4)	<b>28 (45.2)</b>	3 (16.7)	<b>31(41.9)</b>	0 (0.0)	<b>34 (44.2)</b>
V	10	0 (0.0)	<b>10 (17.5)</b>	2 (6.5)	8 (12.9)	1 (5.6)	9 (12.2)	0 (0.0)	10 (13.0)
			p = 0.004		p = 0.004		p = 0.027		p < 0.001
Thickness, mm									
≤1.00	19	11 (36.7)	8 (15.1)	7 (31.8)	12 (19.7)	5 (50.0)	14 (19.4)	<b>6 (85.7)</b>	13 (17.1)
1.01–2.00	14	6 (20.0)	8 (15.1)	4 (18.2)	10 (16.4)	0 (0.0)	14 (19.4)	0 (0.0)	14 (18.4)
2.01–4.00	31*	10 (33.3)	21 (39.6)	8 (36.4)	23 (37.7)	2 (20.0)	28 (38.9)	1 (14.3)	30 (39.5)
>4.00	19	3 (10.0)	16 (30.2)	3 (13.6)	16 (26.2)	3 (30.0)	16 (22.2)	0 (0.0)	19 (25.0)
			p = 0.051		p = 0.532		p = 0.095		p = 0.002
Mitotic Index, high-power fields									
≤5/10	40	<b>22(78.6)</b>	18 (45.0)	16 (76.2)	24 (51.1)	<b>9 (90.0)</b>	31 (54.4)	7 (87.5)	33 (55.0)
>5/10	28*	6 (21.4)	<b>22 (55.0)</b>	5 (23.8)	23 (48.9)	1 (10.0)	<b>26 (45.6)</b>	1 (12.5)	27 (45.0)
			p = 0.012		p = 0.093		p = 0.041		p = 0.128
Ulceration									
Present	44*	15 (41.7)	29 (48.3)	13 (41.9)	31 (47.7)	5 (33.3)	38 (47.5)	1 (11.1)	<b>43 (49.4)</b>
Absent	52	21 (58.3)	31 (51.7)	18 (58.1)	34 (52.3)	10 (66.7)	42 (52.5)	<b>8 (88.9)</b>	44 (50.6)
			p = 0.672		p = 0.756		P = 0.466		p = 0.036
Intratumoral TILs									
Present	38	19 (30.6)	19 (24.7)	15 (25.9)	23 (28.4)	9 (26.5)	29 (27.9)	4 (15.4)	34 (30.1)
Absent	101*	43 (69.4)	58 (75.3)	43 (74.1)	58 (71.6)	25 (73.5)	75 (72.1)	22 (84.6)	79 (69.9)
			p = 0.553		p = 0.891		p > 0.999		p = 0.203
Peritumoral TILs									
Present	50	19 (32.2)	31 (41.9)	18 (34.0)	32 (40.0)	9 (28.1)	41 (41.0)	10 (40.0)	40 (37.0)
Absent	83*	40 (67.8)	43 (58.1)	35 (66.0)	48 (60.0)	23 (71.9)	59 (59.0)	15 (60.0)	68 (63.0)
			p = 0.334		p = 0.602		p = 0.272		p = 0.963

\*Metastatic sample missing from 1 case for NGF analysis. Significant associations are highlighted in bold text (adjusted residual &gt; 1.96).

Table 3 Expression of TRKs and NTs in normal skin and benign pigment cell lesions.

TRK and NT expression	Normal skin (n = 13)	Solar lentigo (n = 7)	Melanocytic nevi (n = 28)				
			Intradermal (n = 16)	Compound (n = 8)	Junctional (n = 2)	Blue (n = 1)	Lentiginous (n = 1)
TrkA							
Negative	13	7	15	7	1	1	1
Positive	0	0	1	1	1	0	0
TrkB							
Negative	13	7	11	5	0	1	1
Positive	0	0	5	3	2	0	0
NGF							
Negative	13	7	10	3	2	1	0
Positive	0	0	6	5	0	0	1
BDNF							
Negative	13	7	0	1	1	0	0
Positive	0	0	16	7	1	1	1

Table 4 Univariate analysis of the impact of TRK and NT expression on OS in 139 patients with cutaneous melanoma.

Category	Group	OS	
		HR (95% CI)	P
TrkA	Positive	1	
	Negative	0.497 (0.266–0.928)	0.028
TrkB	Positive	1	
	Negative	0.657 (0.356–1.210)	0.177
NGF	Positive	1	
	Negative	0.373 (0.148–0.944)	0.037
BDNF	Positive	1	
	Negative	0.088 (0.012–0.641)	0.016

OS: overall survival; HR: hazard ratio; CI: confidence interval.



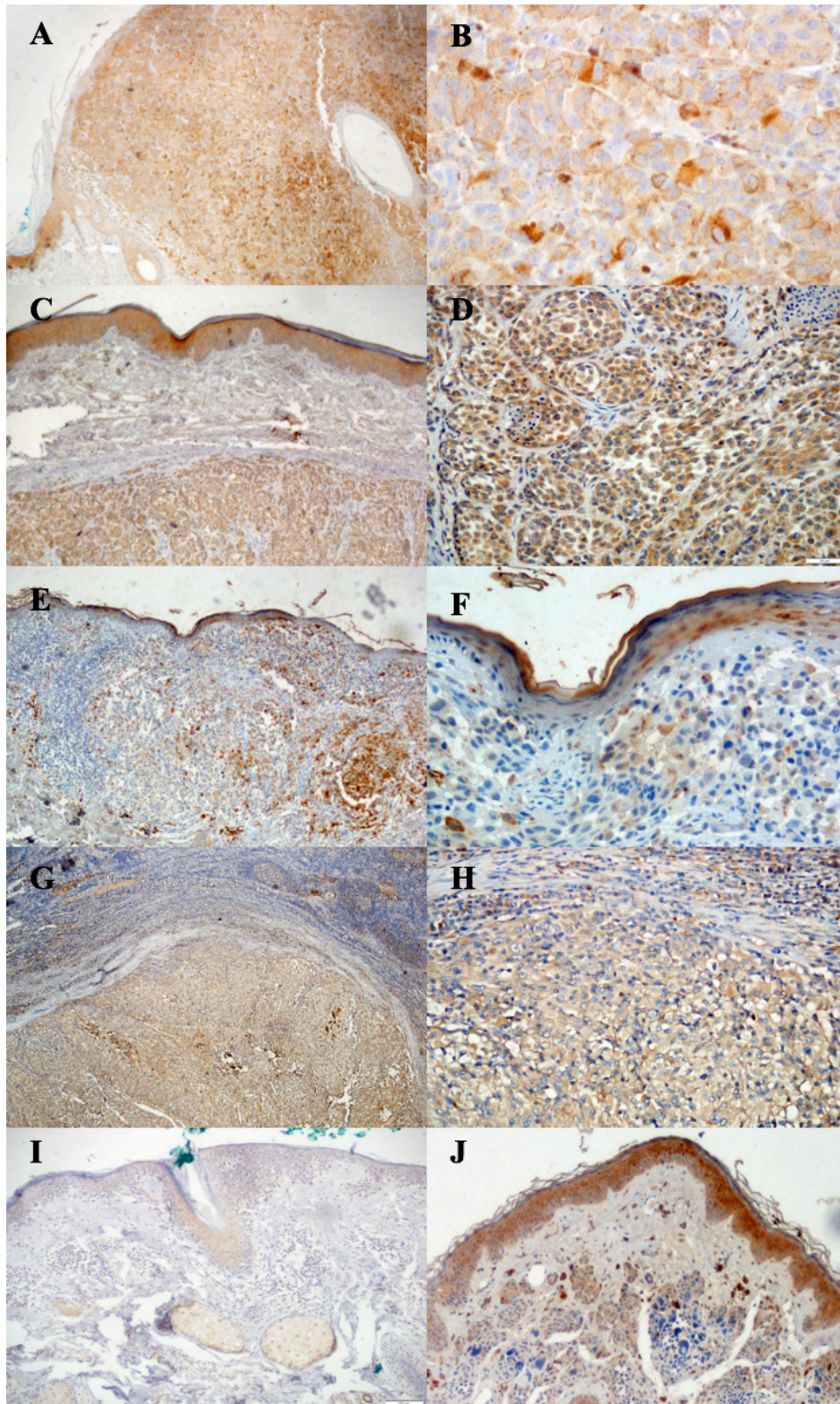
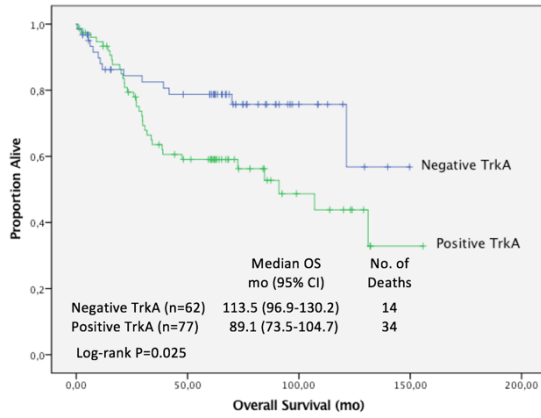
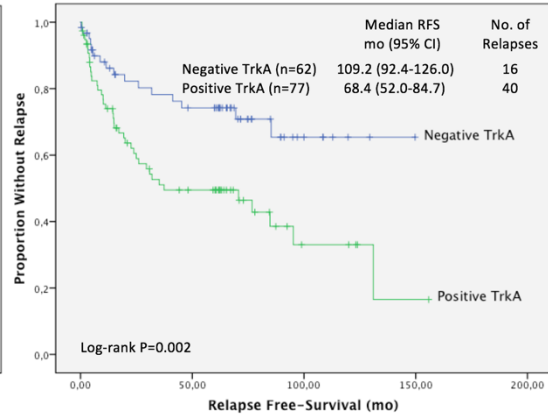


Fig 1. IHC analysis demonstrating expression of TrkB in NM (A, original magnification 50 $\times$ ; and B, original magnification 400 $\times$ ), BDNF in metastatic melanoma (C, original magnification 40 $\times$ ; and D, original magnification 200 $\times$ ), of TrkA in SSM (E, original magnification 40 $\times$  and F, original magnification 200 $\times$ ), of NGF in LNM (G, original magnification 40 $\times$  and H, 200 $\times$ ) and no TrkB expression in melanoma *in situ* (I, original magnification 100 $\times$ ). Benign nevi with weak TrkB immunolabeling (J, original magnification 100 $\times$ ).

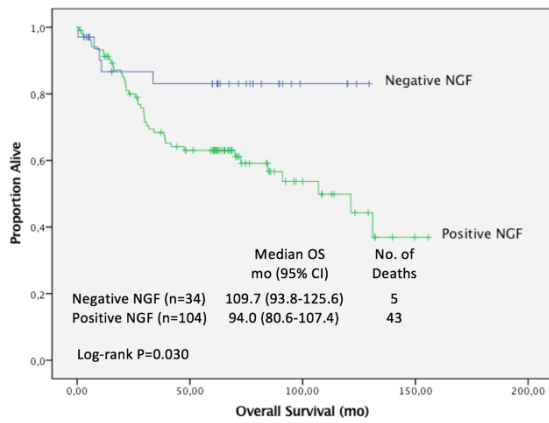
A)



B)



C)



D)

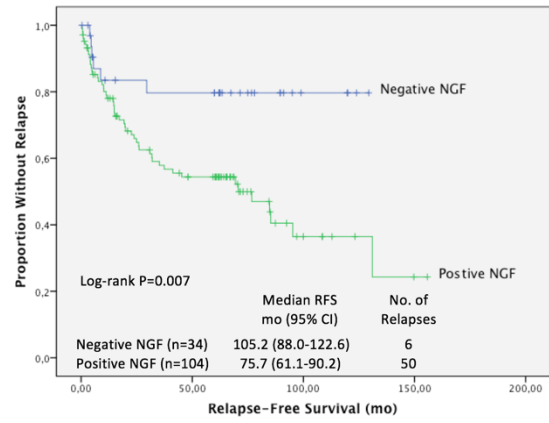
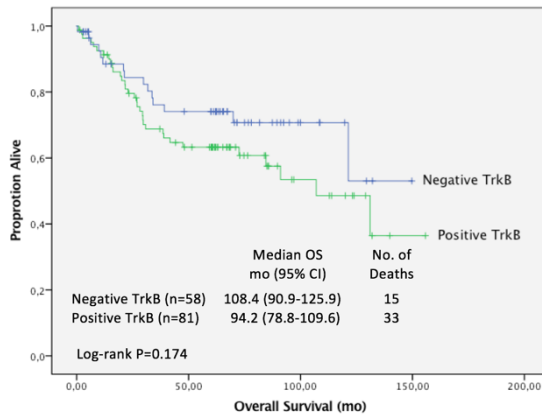
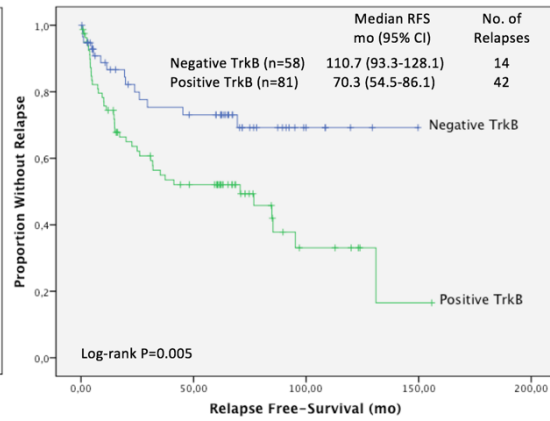


Fig. 2. Kaplan-Meier curves demonstrating the relationship of OS (A and C) and RFS (B and D) with TrkA (A and B) and NGF (C and D) expression.

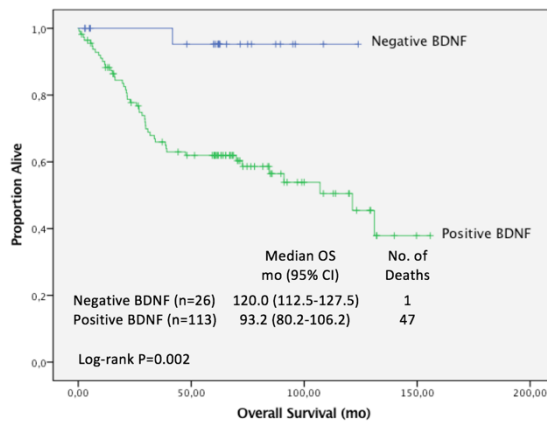
A)



B)



C)



D)

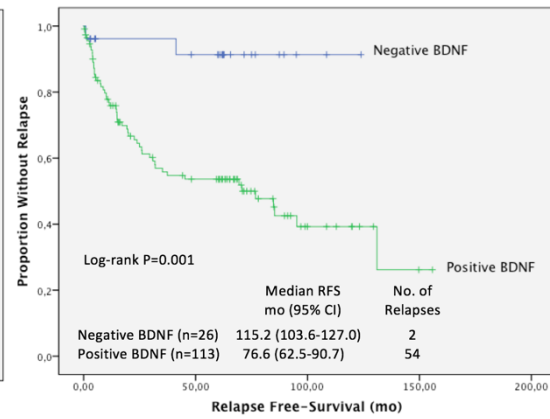


Fig. 3. Kaplan-Meier curves demonstrating the relationship of OS (A and C) and RFS (B and D) with TrkB (A and B) and BDNF (C and D) expression.

Supplementary Table 1 Percentage of cells expressing TrhA, TrkB and BDNF according to the clinicopathological characteristics from 139 patients with cutaneous melanoma

Variable	TrkA	TrkB	BDNF
	Median [q1; q3]	Median [q1; q3]	Median [q1; q3]
Age, years <sup>1</sup>			
<60	40 [30;70]	60 [30;70]	70 [50;90]
≥60	60 [30;80]	70 [45;80]	70 [40;100]
<i>p</i>	0.142	0.130	0.550
Gender <sup>1</sup>			
Female	40 [30;70]	55 [30;80]	70 [30;90]
Male	60 [40;80]	60 [40;80]	80 [50;95]
<i>p</i>	0.106	0.623	0.041
Localization <sup>2</sup>			
Head and neck	50 [30;70]	80 [40;80]	50 [30;70]
Trunk	40 [30;70]	60 [30;70]	70 [50;90]
Upper extremity	45 [30;70]	60 [45;70]	80 [40;90]
Lower extremity	60 [30;70]	60 [40;80]	85 [60;100]
Unknown	60 [40;90]	70 [30;70]	80 [70;80]
<i>p</i>	0.674	0.779	0.057
TNM stage <sup>3</sup>			
0	30 [30;50]	30a [30;40]	40a [30;50]
I (IA, IB)	35 [20;60]	40 [30;70]	55a [30;75]
II (IIA, IIB, IIC)	30 [30;70]	50 [30;70]	60 [30;90]
III	60 [20;90]	75 [45;90]	80 [60;100]
IV	60 [40;70]	70b [55;80]	80b [70;90]
<i>p</i>	0.154	0.004	0.001

q1, first quartile; q3, third quartile.

<sup>1</sup>Mann-Whitney test

<sup>2</sup>Kruskal-Wallis test.

<sup>3</sup>Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test; different letters represent significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

Supplementary Table 2 Percentage of cells expressing TrkA, TrkB and BDNF according to the histopathology of melanoma samples from 139 patients.

Variable	TrkA	TrkB	BDNF
	Median [q1; q3]	Median [q1; q3]	Median [q1; q3]
Histology <sup>1</sup>			
<i>In situ</i>	30 [30;50]	30 [30;40]	60 [30;70]
SSM	40 [30;70]	50 [30;70]	80 [50;95]
NM	60 [40;70]	80 [60;90]	80 [40;90]
ALM	70 [30;80]	70 [60;80]	80 [60;100]
NOS	40 [10;70]	45 [30;70]	80 [50;90]
LM	30 [10;50]	30 [30;30]	30 [10;40]
LMM	10 [10;10]	40 [5;70]	50 [40;50]
DM	-	-	60 [60;60]
MM	60 [40;80]	70 [60;90]	80 [70;85]
<i>p</i>	0.272	0.012	0.032
Clark level <sup>2</sup>			
I	40 [20;60]	30 a [30;40]	50 [30;85]
II	20 [10;30]	40 a [30;50]	50 a [30;90]
III	60 [40;70]	55 [30;60]	70 a [30;90]
IV	60 [40;70]	70 b [50;85]	90 b [70;100]
V	40 [30;80]	70 [45;80]	75 [60;90]
<i>p</i>	0.077	0.017	0.024
Thickness, mm <sup>2</sup>			
≤1.00 mm	30 a [20;50]	45 a [30;65]	60 [50;90]
1.01–2.00 mm	40 a [25;60]	45 a [30;70]	65 [30;90]
2.01–4.00 mm	50 [30;70]	60 [40;90]	80 [50;95]
>4.00 mm	70 b [60;80]	75 b [65;80]	90 [70;95]
<i>p</i>	0.017	0.022	0.152
Mitotic index, high-power fields <sup>3</sup>			
≤5/10	35 [20;60]	60 [35;70]	70 [30;90]
>5/10	70 [40;70]	70 [50;90]	90 [60;100]
<i>p</i>	0.010	0.052	0.024
Ulceration <sup>3</sup>			
Present	60 [40;80]	70 [50;90]	80 [60;90]
Absent	40 [30;60]	50 [30;70]	60 [30;90]
<i>p</i>	0.018	0.018	0.098
Intratumoral TILs <sup>3</sup>			
Present	30 [10;60]	60 [30;70]	60 [30;90]
Absent	60 [40;70]	65 [40;80]	80 [50;90]
<i>p</i>	0.008	0.100	0.172
Peritumoral TILs <sup>3</sup>			
Present	40 [20;60]	60 [30;70]	70 [50;90]
Absent	60 [40;70]	70 [40;85]	75 [45;90]
<i>p</i>	0.007	0.156	0.969

q1, first quartile; q3, third quartile.

<sup>1</sup>Kruskal-Wallis test.<sup>2</sup>Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test; different letters represent significant difference ( $p \leq 0.05$ ).<sup>3</sup>Mann-Whitney test

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O surgimento das novas terapias para o tratamento do melanoma - drogas alvo e imunoterapias – melhorou consideravelmente o cenário, outrora nefasto, do melanoma metastático. O uso dessas novas drogas e o melhor entendimento dos seus mecanismos de ação, indicações e efeitos colaterais, foram um exemplo da importância de se agregar dados clínicos e moleculares. Mais recentemente, uma nova geração de drogas está surgindo, conhecidas pela sua capacidade de agir em diferentes tipos de tumores. Entre elas, estão as drogas que agem nos receptores TRK, como os analisados neste estudo.

Com um número expressivo de amostras de melanoma, em diferentes estágios de progressão, nós encontramos fortes associações entre a expressão dos receptores TRKs, e suas NTs, e os principais fatores prognósticos do melanoma. Além de identificar piores taxas de sobrevida nos casos com maior expressão de TrkB e BDNF. E, semelhante ao que já havia sido descrito em publicações anteriores, também identificamos essas associações com relação à TrkA e NGF. Foi encontrada uma ausência de expressão dessas proteínas na pele normal e no lentigo simples, evoluindo para uma gradativa maior expressão à medida que o estágio do melanoma progride de *in situ* para metastático. Por outro lado, ocorreu uma expressão considerável de TrkA, TrkB, NGF e BDNF nas amostras de nevos, sugerindo que essa neurotrofina e seu receptor, possam estar envolvidos em um mecanismo fisiológico protetivo, provocando um estado de senescência nos nevos.

## **10 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Identificamos fortes associações entre a expressão de TRKs e NTs, e a evolução do melanoma, mas futuros estudos são necessários para avaliar se essas vias de sinalização estão efetivamente envolvidas nos processos de evolução do melanoma. Assim como, buscar definir se a ativação de BDNF/TrkB e NGF/TrkA, promovem a progressão do tumor, ou ocorre como um mecanismo compensatório, e fisiologicamente protetivo, envolvido na senescência tumoral.