

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

**AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E IMUNO-  
HISTOQUÍMICAS DOS NEVOS MELANOCÍTICOS RECORRENTES**

RENATA HECK

Porto Alegre  
2020

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

**AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E IMUNO-  
HISTOQUÍMICAS DOS NEVOS MELANOCÍTICOS RECORRENTES**

RENATA HECK

Orientador: Prof. Dr. Renato Marchiori Bakos

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

Porto Alegre  
2020

## CIP - Catalogação na Publicação

Heck, Renata

Avaliação das características histológicas e imuno-histoquímicas dos nevos melanocíticos recorrentes / Renata Heck. -- 2020.

71 f.

Orientador: Renato Marchiori Bakos.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Nevos. 2. Imuno-histoquímica. 3. Histopatologia.  
I. Bakos, Renato Marchiori, orient. II. Título.

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho com todo meu amor à minha filha Lívia, que preenche minha vida de sentido e enche meus dias de alegria.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente ao meu orientador, professor Renato Marchiori Bakos pelo constante incentivo no cenário acadêmico, contribuindo de maneira inestimável para o meu crescimento profissional, além de ser constante exemplo de profissionalismo ético.

Agradeço imensamente ao professor André Cartell, pela sua grande contribuição neste trabalho, e também por todos ensinamentos compartilhados ao longo destes anos.

Agradeço aos inúmeros mestres que tive ao longo da minha formação dermatológica, cujas contribuições individuais foram essenciais para a construção da minha identidade profissional.

Agradeço às funcionárias Gabriela Remonato e Flávia Giusti, do serviço de patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela pronta e gentil ajuda nas etapas práticas do trabalho.

Agradeço aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciência Médicas pela solicitude em resolver todas as etapas burocráticas para realização desta defesa.

Agradeço aos meus pais, Leni Heck e Sérgio Heck, por terem me ensinado, de maneira tão sólida, a importância do estudo. Agradeço a minha irmã, Bianca Heck, pelo companheirismo e torcida incondicional.

Agradeço ao meu esposo, Alexandre Klamt, por entender todas as ausências nos últimos meses, e por sempre incentivar o meu crescimento profissional.

Agradeço ao meu grande amigo e colega, Juliano Peruzzo, pela paciência e presença constante dando apoio e acalento.

Agradeço a todos os pacientes que participaram deste projeto, por sua contribuição gratuita ao conhecimento científico.

Agradeço àqueles que ainda acreditam e lutam por uma universidade pública de qualidade.

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano”.

(Isaac Newton)

## Resumo em português

### BASE TEÓRICA:

O nevo recorrente, é uma lesão pigmentada no sítio de retirada de nevo melanocítico benigno prévio, sendo um dos importantes diagnósticos diferenciais do melanoma. Houve uma evolução no conhecimento clínico e dermatoscópico acerca destas lesões, porém ainda faltam estudos avaliando suas características histopatológicas e imuno-histoquímicas. Pouco também é conhecido acerca de seus mecanismos fisiopatogênicos.

### OBJETIVOS:

Avaliar as características histológicas e imuno-histoquímicas de uma amostra de nevos melanocíticos recorrentes e a associação da expressão imuno-histoquímica de BRAF nestes nevos com preditores clínicos para recorrência a partir da avaliação retrospectiva das características clínicas e dermatoscópicas de suas lesões primárias.

### MÉTODOS:

Realizou-se um estudo transversal, com uma amostra de 58 nevos recorrentes (NRs) coletados a partir de 224 nevos removidos cirurgicamente por “shaving” foi avaliada retrospectivamente quanto às seguintes características à histopatologia: simetria arquitetural, presença de padrão trizonal, presença de nevo residual, hiperplasia lentiginosa, disseminação pagetoide, padrão confluyente dos ninhos melanocíticos, “dropping off” de células névicas na cicatriz, presença de melanófagos, fibrose, inflamação, envolvimento névico anexial, envolvimento névico perineural, mitoses e atipia nuclear. Além disso, foi avaliada a expressão imuno-histoquímica de HMB-45, tirosinase, KI-67 e BRAF-V600E nas lesões. Finalmente, foi analisada a associação da expressão imuno-histoquímica de BRAF nos nevos recidivados com aspectos clínicos e dermatoscópicos de suas lesões primárias.

### RESULTADOS:

Verificou-se a presença de padrão trizonal em 84% das lesões. A maioria dos NRs apresentou assimetria arquitetural (56%) e hiperplasia lentiginosa (76%). A fibrose (98%) e inflamação (96%) foram encontrados em quase toda a amostra. Viu-se a confluência de ninhos juncionais em 12% das lesões e o “dropping off” de células

névicas para a cicatriz dérmica em 1,7% delas. Encontrou-se a presença de melanófagos na frequência de 79% e o comprometimento anexial pelas células névicas em 22% dos casos. Não encontramos envolvimento perineural ou mitoses em nenhuma lesão avaliada. Achados comuns ao melanoma como a disseminação pagetoide e a atipia celular foram encontrados de maneira leve a moderada em respectivamente 30 e 15% das lesões.

A análise imuno-histoquímica teve imunomarcagem positiva para HMB-45 (98%) e tirosinase (91%) com padrão em gradiente, com positividade forte no componente juncional, tendendo a negativar conforme havia aprofundamento das porções névicas. O KI-67 apresentou índice proliferativo médio de 2,83%, quase que exclusivamente no componente juncional.

A expressão positiva de BRAF foi encontrada em 42 NRs (72,4%). Observou-se que a marcação se deu de maneira exclusiva na porção juncional em 7 lesões, na porção dérmica em 28 e em ambas as localizações em 7 lesões. A análise da expressão de BRAF com as características clínicas e dermatoscópicas das lesões primárias demonstrou uma associação para a localização das mesmas em áreas fotoexpostas ( $p=0,01$ ), e para a presença dermatoscópica de hiperpigmentação anular ( $p=0,041$ ).

#### CONCLUSÃO:

Demonstramos que a histopatologia típica dos nevos recorrentes apresenta padrão trizonal associado a assimetria arquitetural, e achados histológicos comuns incluem hiperplasia lentiginosa, fibrose, inflamação, ausência de mitoses e ausência de atipia celular. Demonstramos que estas lesões apresentam baixo índice proliferativo através da expressão nuclear de KI-67, além de expressão em gradiente dos marcadores HMB-45 e tirosinase. Ainda evidenciamos alto índice de expressão de BRAF, sendo que a marcação se dá de maneira independente nas porções juncionais e dérmicas da recorrência. Por fim, esta expressão parece ocorrer mais em lesões de áreas fotoexpostas e também associada a lesões com pigmentação anular da lesão névica primária na dermatoscopia.

**PALAVRAS CHAVE:** nevo recorrente, pseudomelanoma, nevo melanocítico, imuno-histoquímica, BRAF



## Resumo em inglês

### BACKGROUND:

A recurrent nevus is a pigmented lesion occurring at the site of removal of a previous benign melanocytic nevus. It may mimic clinically melanoma lesions. There are well-known clinical and dermoscopic aspects already described for these lesions, however studies that assess their histopathological and immunohistochemical features are scarce and little is also known regarding their pathophysiological mechanisms.

### OBJECTIVES:

To evaluate the histological and immunohistochemical features of a sample of recurrent melanocytic nevi, and the association of the immunohistochemical expression of BRAF in these nevi with clinical and dermoscopic predictors for recurrence evaluated retrospectively in their primary lesions.

### METHODS:

A sample of 58 recurrent nevi (RNs) from 224 melanocytic nevi removed by shave biopsy were retrospectively evaluated for the presence of the following histopathological features: architectural symmetry, a trizonal pattern, a residual nevus, lentiginous hyperplasia, pagetoid spread, confluent melanocytic nests, nevus cells 'dropping off' into the scar, melanophages, fibrosis, inflammation, adnexal nevus involvement, perineural nevus involvement, mitosis, and nuclear atypia. In addition, the immunohistochemical expression of HMB-45, tyrosinase, KI-67 and BRAF-V600E in the lesions was evaluated. Finally, we looked at the association of the immunohistochemical expression of BRAF in the recurrent nevi with clinical and dermoscopic aspects of their primary lesions.

### RESULTS:

A trizonal pattern was found in 84% of the lesions. Most RNs presented architectural asymmetry (56%) and lentiginous hyperplasia (76%). Fibrosis (98%) and inflammation (96%) were found in almost the entire sample. Uncommon findings were the confluence of junctional nests (12%) and the "dropping off" of nevus cells into the dermal scar (1.7%). Melanophages were found in 79%, and adnexal involvement by nevus cells in 22% of the cases. We found no perineural involvement or mitosis in any

of the evaluated lesions. Findings common to melanoma, such as pagetoid spread and cell atypia, were found to be slight to moderate in 30% and 15% of the lesions, respectively.

The immunohistochemical analysis showed graded expression of positive immunostaining for HMB-45 (98%) and tyrosinase (91%), with strong positivity in the junctional component, tending to be negative in the deeper portions of the nevi. KI-67 exhibited an average proliferative index of 2.83%, almost exclusively in the junctional component.

The BRAF expression was found to be positive in 42 NRs (72.4%). It occurred exclusively in the junctional portion in 7 lesions, in the dermal portion in 28 and in both locations in 7 lesions. Moreover, BRAF positive expression was associated to the location in sunexposed areas ( $p = 0.01$ ), and for the dermoscopic presence of annular hyperpigmentation ( $p = 0.041$ ).

#### CONCLUSION:

We have demonstrated that the most common histopathologic pattern of recurrent nevi is composed of a trizonal pattern associated with architectural asymmetry. Other common histological findings include lentiginous hyperplasia, fibrosis, inflammation, absence of mitosis and absence of cell atypia. We also demonstrated by Ki 67 expression that these lesions have a low proliferative rate and that HMB-45 and tyrosinase expressions demonstrate a gradient pattern. Moreover, we observed that BRAF expression positivity is high among recurrent nevi, occurring independently in the junctional and dermal portions of the nevi. Finally, it seems that this expression is more common in lesions on sunexposed areas and is associated with the occurrence of annular pigmentation on dermoscopy of primary lesions.

**KEYWORDS:** recurrent nevus, pseudomelanoma, melanocytic nevus, immunohistochemistry, BRAF

## Lista de Ilustrações

### Revisão da Literatura

Figura 1. Fluxograma da estratégia de busca para localizar e selecionar as informações da pesquisa .....19

Figura 2- Marco conceitual: processo diagnóstico dos nevos melanocíticos recorrentes.....37

### Artigo em inglês

Figure 1- HE (200x) trizonal pattern: lentiginous junctional component, associated with a dermal fibrous scar above nests of residual deep nevus cells .....61

Figure 2- HMB-45 (100x) gradient pattern: strong expression in the junctional component, fading expression towards deeper nevi zones.....61

Figure 3- BRAF (100X) expression in the junctional and dermal component.....61

## Lista de Tabelas

### Revisão da Literatura

Quadro 1 - Características histológicas dos nevos melanocíticos recorrentes .....36

### Artigo em inglês

Table 1: Histological characteristics of the recurrent nevi .....62

Table 2: Table 2: Immunohistochemical characteristics of recurrent nevi.....62

Table 3: Frequency of qualitative clinical and dermoscopic features of primary melanocytic lesions and correlation with BRAF mutation .....63

## Lista de abreviaturas e siglas

BRAF - *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

HMB-45 - *human melanoma black 45*

NR – nevo recorrente

NRs- nevos recorrentes

MART-1 - *melanoma antigen recognized by T cell 1*

MiTF-1 - *microphthalmia transcription factor 1*

PCR - reação em cadeia da polimerase

MES – melanoma de espalhamento superficial

*RN* – *recurrent nevus* (nevo recorrente)

*RNs*- *recurrent nevi* (nevos recorrentes)

RUV - radiação ultravioleta

## Sumário

1. Introdução .....	16
2. Revisão da literatura .....	18
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações .....	18
2.2 Teorias da nevogênese .....	19
2.3 Nevos melanocíticos recorrentes .....	20
2.3.1 Fisiopatologia dos nevos recorrentes .....	22
2.3.2 Características clínicas dos nevos recorrentes .....	23
2.3.3 Dermatoscopia dos nevos recorrentes .....	24
2.3.4 Microscopia confocal dos nevos recorrentes .....	25
2.3.5 Histopatologia dos nevos recorrentes.....	26
2.4 Imuno-histoquímica das lesões melanocíticas .....	28
2.4.1 Imuno-histoquímica dos nevos recorrentes .....	31
2.5 Mutações de BRAF.....	32
2.5.1 Mutações de BRAF nos nevos melanocíticos .....	33
3. Marco conceitual.....	37
4. Justificativa .....	38
5. Objetivos .....	39
5.1 Objetivo principal .....	39
5.2 Objetivos secundários .....	39
6. Referências bibliográficas da revisão da literatura .....	40
7. Artigo em inglês .....	48
7.1 Title.....	48
7.2 Abstract.....	48
7.3 Introduction.....	49
7.4 Methods.....	51
7.5 Results.....	53

76 Discussion.....	54
7.7 References.....	58
8. Considerações finais .....	65
9. Perspectivas futuras .....	66
10. Anexos .....	67

## 1. Introdução:

O nevo recorrente (NR), lesão pigmentada no sítio de retirada de nevo melanocítico benigno prévio, é um dos importantes diagnósticos diferenciais do melanoma de espalhamento superficial, sendo o reconhecimento das suas características clínicas e dermatoscópicas de grande importância para se evitar tratamentos cirúrgicos desnecessários, principalmente naqueles casos em que não se conhece o diagnóstico histopatológico da lesão primária.

Houve uma evolução no conhecimento acerca destas lesões, sabendo-se hoje que ocorrem em pacientes mais jovens, em curto período de tempo após a excisão do nevo original, a maioria dentro dos 6 primeiros meses, e tendem a cessar seu crescimento com o tempo (1, 2, 3). Costuma ser mais frequente o seu aparecimento com o método cirúrgico de *shaving*, e dentre os subtipos de nevos comuns costuma ocorrer mais quando a lesão inicial apresenta componente dérmico (1, 2, 4).

Os achados dermatoscópicos mais relevantes são a presença de linhas radiais segmentares, pigmentação heterogênea e glóbulos. Chama a atenção que a lesão recorrente dos nevos não costuma ultrapassar o limite cicatricial, dado muito relevante ao se diferenciar do melanoma recorrente, cujas margens da cicatriz não são respeitadas (3, 5, 6, 7, 8).

Cabe lembrar que o diagnóstico clínico nem sempre é possível e a análise histopatológica da lesão pode ser necessária. Poucos estudos descreveram suas características histopatológicas. O padrão clássico descrito é o trizonal, constituído por um componente juncional lentiginoso sobre uma cicatriz dérmica e a presença de células névicas dérmicas profundas residuais (4). Contudo, achados de disseminação pagetoide proeminente, infiltrado inflamatório, assimetria arquitetural, atipia melanocítica, e acometimento folicular foram descritos, demonstrando que também histologicamente estas lesões podem representar um desafio diagnóstico (1, 4, 9).

Aventa-se que os nevos recorrentes (NRs) apresentem o mesmo padrão de expressões imuno-histoquímicas do que os nevos melanocíticos benignos, porém pouco se encontra na literatura acerca das características imuno-histoquímicas destas lesões, (9, 10) sendo que a técnica pode ter grande importância na diferenciação daquelas com histologia atípica.

Pouco se evoluiu também acerca da fisiopatogenia dos nevos recorrentes. As mutações ativadoras do BRAF (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*), um



protooncogene da família das serina-treonina quinases que regula o crescimento celular, são encontradas com grande frequência tanto nos melanomas quanto nos nevos melanocíticos benignos, acreditando-se que seja um evento inicial na gênese tumoral melanocítica (11, 12, 13). Sua presença nunca foi estudada nos NRs, não se tendo conhecimento do seu papel na gênese destas lesões.

Objetiva-se neste estudo caracterizar os nevos melanocíticos recorrentes quanto à sua histopatologia e marcação imuno-histoquímica, incluindo marcador para detecção da mutação de BRAF.

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações:

A revisão da literatura foi focada nos aspectos histopatológicos e imunohistoquímicos relacionados aos nevos recorrentes. Também se procurou artigos originais que pesquisassem a presença de mutação de BRAF nos nevos recorrentes.

A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS, SciELO, PubMed e Catálogo de teses e dissertações da CAPES. Não houve limitação de data ou língua.

Foram realizadas buscas através dos termos “Recurrent nevus”, “Recurrent melanocytic nevi”, “Recurrent melanocytic nevus”, “Regenerating naevus”, “Regenerating naevi”, “Pseudomelanoma”, “Histopathology”, “Immunohistochemistry”, “BRAF mutation”, “BRAF V600E” e suas combinações.

Excluíram-se artigos repetidos nas bases de dados, artigos cujo conteúdo na íntegra não pode ser acessado, relatos de caso, artigos de revisão e artigos cujos assuntos não se relacionavam ao tema proposto.

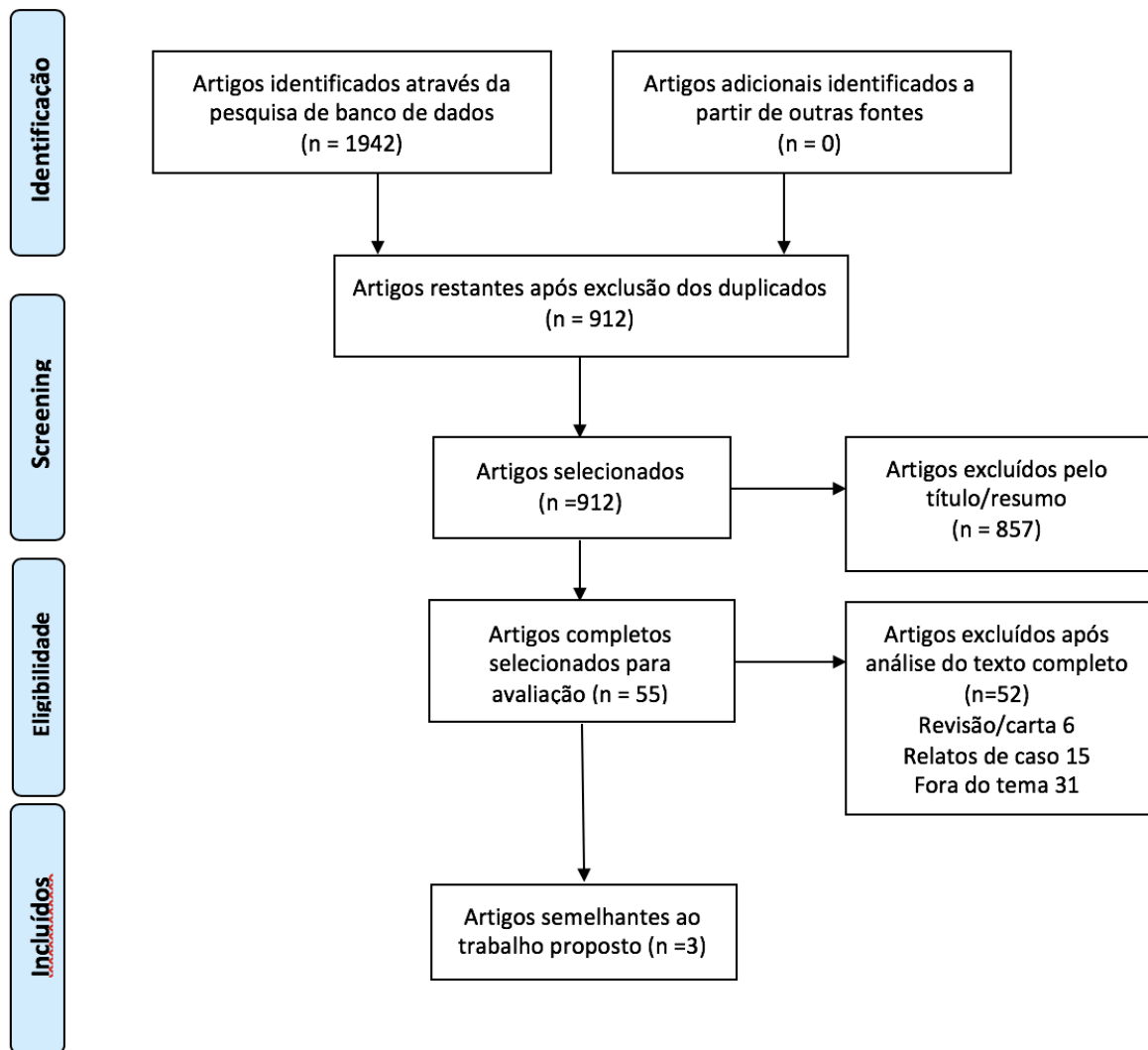


Figura 1. Fluxograma da estratégia de busca para localizar e selecionar as informações da pesquisa

## 2.2 Teorias da nevo gênese:

Diversas teorias já foram propostas para explicar os processos envolvidos na gênese dos nevos melanocíticos, sendo que a primeira delas data de 1893, onde foi sugerido por Unna uma progressiva migração das células névicas com origem na junção dermopidérmica em direção à derme profunda (14, 15, 16). Devido ao maior conhecimento atual dos padrões dermatoscópicos, esta teoria tende a perder força pois sabe-se que os nevos de padrão globular, com maior componente dérmico, tendem a ter maior prevalência em jovens, contrastando com os de padrão reticular, com o componente juncional mais proeminente, predominando na idade adulta (14, 17, 18).

Em seguida, por observar as diferenças morfológicas entre as porções

superficiais e profundas dos nevos, Masson propôs uma dupla origem névica, onde as células mais superficiais seriam originadas de melanoblastos epidérmicos, enquanto as porções mais profundas se originariam de células de Schwann, sendo que mais tarde foi demonstrada a origem embriológica comum destas (16, 19).

Após o conhecimento de que os melanócitos se originam da crista neural, Cramer propôs uma teoria contrária à de Unna, onde estas células fariam uma migração ascendente através das fibras nervosas, semelhante a eventos embriônicos (14, 16, 20).

Em 2004, um estudo em murinos mostrou a presença de células-tronco pluripotentes derivadas da crista neural localizadas na protuberância do folículo piloso, que poderiam representar a origem das células melanocíticas no período pós-natal, e explicaria o constante achado de células névicas ao redor dos folículos na porção dérmica do nevo, além de possivelmente apresentar relevância na repigmentação de cicatrizes e lesões de vitiligo (16, 21).

Mais recentemente, Zalaudek *et al*, propuseram a teoria das “duas rotas” da nevogênese, baseados nas observações dermatoscópicas de prevalências distintas dos padrões névicos globulares e reticulares de acordo com a faixa etária dos pacientes. A via constitutiva ou endógena, engloba aqueles nevos globulares surgidos na infância, geneticamente determinados, que reteriam suas características dermatoscópicas ao longo da vida, e que apresentam ninhos nas porções dérmicas, sugerindo a teoria da origem ascendente. Por outro lado, os nevos com padrão reticular, surgidos na adolescência, poderiam ser induzidos por fatores exógenos, como a RUV e tenderiam à regressão ao longo da vida. Estes últimos se originariam de uma proliferação juncional de melanócitos diferenciados, que posteriormente se espalhariam horizontalmente ao longo da junção dermoepidérmica (14, 22).

Atualmente, ainda não se compreende totalmente os processos envolvidos na nevogênese, porém alguns estudos têm avaliado de maneira mais específica as células tronco foliculares (23, 24). Além disso, especula-se que células tronco encontradas na bainha nervosa também possam se diferenciar em células melanocíticas contribuindo no processo (23, 25).

### 2.3 Nevos melanocíticos recorrentes:

É denominado nevo recorrente, nevo persistente, nevo regenerado ou pseudomelanoma, a lesão melanocítica que se desenvolve no sítio de remoção prévia de um nevo melanocítico benigno.

Primordialmente, aventava-se que a remoção parcial de nevos poderia levar à transformação maligna das células remanescentes, porém Walton *et al*, em 1957, refutou esta teoria existente ao estudar uma amostra de 112 lesões removidas por *shaving* seguido de eletrocoagulação, e demonstrar que apesar da repigmentação de grande parte delas, não se encontrou histologia maligna nas lesões recorrentes ou precursoras (26, 27).

Kornberg e Ackerman, em 1975, foram os primeiros a descrever esta lesão com o nome de pseudomelanoma, devido a sua semelhança clínica e histológica com o melanoma de espalhamento superficial (MES) em que pese, mantinham-se como nevos benignos. Em sua série, foram avaliadas 8 lesões pigmentadas que surgiram em sítios de remoção de nevos benignos prévios em até 6 meses após o procedimento inicial. Os aspectos clínicos descritos eram de lesões planas, com pigmentação variada e bordas irregulares, clinicamente lembrando o melanoma de espalhamento superficial. As características histológicas descritas foram: 1) melanócitos circunscritos na epiderme, sem tendência de se estender lateralmente entre os queratinócitos periféricos à lesão; 2) melanócitos atípicos confinados à epiderme; 3) poucos ou nenhum melanócito em mitose; 4) aumento do número de melanócitos isolados ou em ninhos na camada basal ou acima desta; 5) variação no tamanho e na forma dos ninhos de melanócitos; 6) ninhos melanocíticos confluentes, bem como ninhos discretos; 7) poucos melanócitos atípicos, com núcleos grandes, hipercromáticos e pleomórficos; 8) fibrose na derme papilar e algumas vezes na derme reticular; 9) infiltrado linfocitário, esparso, superficial e perivascular. Foi enfatizado por eles o comportamento benigno destas lesões, apesar de muitos dos achados histopatológicos descritos serem comuns ao MES (28).

O aparecimento de NRs já foi descrito após diversos métodos de remoção da lesão névica primária, como exérese tangencial (*shaving*), exérese com fechamento primário, dermoabrasão, cauterização química com ácidos, eletrocauterização, crioterapia e “lasers” ablativos (29, 30, 31, 32, 33, 34). Estas lesões melanocíticas também já foram encontradas em sítios de queimaduras e radiodermite, bem como em áreas cutâneas cicatrícias de outras doenças prévias como epidermólise bolhosa distrófica e doença de Hailey-Hailey (35, 36, 37, 38).

Estudos descritivos relatam incidências de NRs que variam entre 2,8 a 30%, sendo que os valores mais altos encontrados derivam de estudos onde o método cirúrgico empregado foi o *shaving*. Nos estudos que incluíram excisão primária com sutura, as incidências demonstraram-se menores, demonstrando um possível papel importante do remanescente névico na gênese da lesão recidivada (2, 39, 40, 41, 42).

A grande importância do maior conhecimento acerca das características dos NRs, implica no pronto diagnóstico diferencial com o melanoma, nem sempre fácil do ponto de vista clínico e dermatoscópico, levando muitas vezes a exérese desnecessárias. Ressalta-se também a dificuldade diagnóstica inclusive na avaliação histológica, sendo necessário algumas vezes lançar mão de métodos diagnósticos auxiliares como a imuno-histoquímica (42).

### 2.3.1 Fisiopatogenia dos nevos recorrentes

Assim como dos nevos melanocíticos adquiridos, o mecanismo fisiopatológico da recidiva ainda não foi completamente esclarecido e, apesar de várias teorias propostas nenhuma se mostrou definitiva.

Primeiramente, Gougerot propôs que a “semeadura” de células durante o procedimento de remoção da lesão névica original, seria a responsável pela posterior recidiva local (27, 43).

Outra teoria foi aventada por Schoenfeld e Pinkus sugerindo que o estímulo juncional após a remoção parcial do nevo, poderia levar ao retorno a um estágio inicial da história natural da maturação névica, originando um “novo” nevo derivado de células dos folículos pilosos remanescentes e da periferia da lesão (27, 44). Demonstrou-se posteriormente, em um estudo laboratorial com modelo murino, a presença de células tronco progenitoras da linhagem melanocítica em porções inferiores dos folículos pilosos, dando força a esta teoria (45).

Outras hipóteses aventadas enfatizam a importância do papel das células residuais dérmicas pós-cirúrgicas, em possivelmente gerar um novo estímulo local para o crescimento névico ou, até mesmo, que esta proliferação seja efetuada a partir delas mesmas (46, 47). Contrapõe-se à ideia de proliferação das células remanescentes, o fato de alguns nevos primários serem completamente excisados,

sem o encontro histológico de células névicas residuais, e também apresentarem recidiva (1).

### 2.3.2 Características clínicas dos nevos recorrentes:

Os NRs apresentam-se clinicamente como máculas de coloração marrom a enegrecida, clinicamente assimétricas e com bordas irregulares, achados comuns a lesões melanocíticas malignas. É comum também a identificação da cicatriz do procedimento cirúrgico prévio, com a lesão pigmentada respeitando os limites da cicatriz, não se estendendo para a pele normal adjacente. Por outro lado, a maioria dos melanomas recidivados deverá apresentar um comportamento agressivo, comum as neoplasias malignas, mantendo seu crescimento horizontal de forma desorganizada além dos limites cicatriciais (3, 7, 42).

É fundamental na caracterização clínica de um nevo recorrente a recuperação do histórico da lesão primária que foi removida. Principalmente, recuperar os dados relativos ao diagnóstico histológico desta lesão pode ser definitivo para sua constatação. É mais prevalente em pacientes de sexo feminino, sendo que cerca de 65% a 85% destas lesões são encontradas em mulheres, porém acredita-se que possa dever-se à maior procura destas para remoção de lesões benignas por motivos estéticos. Além disso, especula-se que suas visitas mais assíduas a reavaliações médicas possam fazer com que as s recorrências sejam mais percebidas (1, 2, 4, 48).

A idade é um fator preditor da recorrência, sendo que NRs já foram relatados em uma distribuição etária ampla, variando dos 6 aos 92 anos de idade. Porém, observa-se que há uma grande tendência a encontrar os NRs em uma faixa etária jovem, predominando abaixo dos 40 anos (1, 48). Estudo prospectivo realizada pelo nosso grupo de pesquisa foi capaz de predizer uma diminuição na incidência dos NRs em 3% a cada ano adicional de idade, especulando-se que sua ocorrência possa estar associada a mudanças dinâmicas relacionadas à senescência névica (2).

Os estudos com maiores números amostrais, evidenciam como sítios mais frequentes de recorrência o dorso (49-57%), seguido pelo abdome (12-15%) e membros (1, 48). Observou-se também que o tempo médio de recorrência é entre 8 e 9,7 meses, sendo que a maioria das lesões (54-64%) recorre dentro dos primeiros 6

meses após o procedimento inicial, dado que difere do melanoma, cuja recorrência pode acontecer de meses a anos após a excisão primária (1, 4, 7, 9, 48, 49).

Há divergência quanto ao padrão histológico predominante da lesão inicial nos nevos recorrentes. King *et al*, em sua amostra de 350 NRs, descreve padrão inicial mais frequente de nevos displásicos (72% versus 26% de nevos comuns). Já Sommer *et al*, avaliou 108 lesões, e apresentou dados contrários com predominância de nevos comuns (64% versus 27% de nevos displásicos) (1, 48). Dentre os subtipos de nevos comuns, há consenso em afirmar que os nevos compostos são os que apresentam maior recorrência, seguidos pelos intradérmicos e por último os juncionais (1, 2, 4). Foram descritas recorrências derivadas também de nevos congênitos, nevo de Spitz, nevo azul e nevo de Reed (1, 32, 50, 51).

Mais um dado que ajuda na diferenciação do NR com o MES, é a observação da tendência dos nevos recorrentes apresentarem crescimento seguido de estabilidade, contrariamente aos melanomas, cujas lesões apresentam aumento progressivo (3).

### 2.3.3 Dermatoscopia dos nevos recorrentes:

A dermatoscopia é um método simples, rápido, não invasivo, cada vez mais utilizado para auxílio diagnóstico de lesões cutâneas. Ela permite, através de um sistema de lente e filtros de aumento associado a uma fonte de luz, a visualização de estruturas presentes na epiderme, junção dermoepidérmica e na derme superior, além dos vasos do plexo superior, a partir da polarização cruzada da luz através dos filtros. A dermatoscopia digital consiste na captura e armazenamento das imagens dematoscópicas, permitindo sua comparação ou monitoramento em intervalos regulares. Existe uma estreita correlação entre as estruturas dermatoscópicas e as estruturas histológicas, sendo o método de grande validade para diferenciação entre lesões cutâneas de origem benigna e maligna (52, 53). Existe uma curva de aprendizado necessária para a melhor utilização da técnica. O uso da dermatoscopia por profissionais treinados melhora significativamente a acurácia diagnóstica quando comparado somente com a avaliação clínica (54).

Botella-Estrada *et al*, estudaram dermatoscopicamente e histologicamente 95 cicatrizes pigmentadas e descreveram a presença de glóbulos e pigmentação heterogênea como os dois achados dermatoscópicos mais fortemente relacionados



aos NRs, seguidos pela presença de rede pigmentar irregular e a ausência de estrias (5).

Um outro achado característico à dermatoscopia dos NRs são as linhas radiais segmentares, que partem da porção mais central da lesão e se estendem em todas as direções (6).

Podemos observar com mais acurácia ao exame dermatoscópico do que somente clinicamente, que o NR não ultrapassa os limites da cicatriz inicial, sendo lesões que se estendem além dela, fortemente sugestivas de melanoma (3, 7).

Um estudo multicêntrico, avaliou as diferenças dermatoscópicas entre nevos recorrentes e melanomas recorrentes. Foram avaliadas 160 lesões, sendo 98 NRs, encontrando-se a presença de linhas radiais como o achado mais comum nas lesões de origem benigna. A assimetria de estruturas e a hiperpigmentação excêntrica foram mais encontrados no melanoma. Mais uma vez afirmou-se que a pigmentação se estendendo além dos limites cicatriciais foi mais comum nos melanomas (87,1% versus 42,9% nos nevos recorrentes), sendo este o achado mais importante na diferenciação entre estas duas entidades (8).

Caracterizamos em estudo prévio, alguns fatores dermatoscópicos preditores de recorrência névica ao se avaliar os nevos melanocíticos primários antes da sua excisão por *shaving*. A presença de múltiplas cores, pontos, presença de pelo terminal, e pigmentação anular circundando as estruturas anexiais se correlacionaram com maior chance de recorrência local (2).

#### 2.2.4 Microscopia confocal dos nevos recorrentes:

A microscopia confocal (MC) é um método não invasivo, que gera imagens *in vivo* dos tecidos com uma resolução a nível celular. Esta técnica utiliza um laser com comprimento de onda próximo ao infravermelho que faz uma varredura horizontal da pele, produzindo imagens celulares detalhadas em preto e branco da epiderme até a derme papilar. Esta técnica é examinador-dependente e necessita do acoplamento das lentes objetivas sobre a lesão de maneira a mantê-las fixas durante o exame. Este método diagnóstico é a ligação entre a dermatoscopia e a histologia devido a sua alta resolução e ao fato de não necessitar intervenções invasivas (55).

A MC já foi usada para avaliar um pequeno número de lesões recorrentes em

cicatrices de exéreses prévias. Enquanto as lesões névicas benignas não apresentavam propagação lateral ou pagetoide proeminente de melanócitos, e também demonstravam em sua maioria ausência de ninhos atípicos juncionais, as lesões de recidiva de melanoma exibiam melanócitos com formas dendríticas dispostos em ninhos com propagação pagetoide e lateral, estendendo-se além da cicatriz e também apresentavam atipia celular marcante (49).

Já foram descritas lesões recorrentes com presença de padrão irregular de distribuição dos ninhos e das células névicas a nível da junção dermoepidérmica, e também há a descrição de células pleomórficas de padrão pagetoide (56, 57, 58). A distinção entre células de Langerhans e melanócitos pode ser difícil, ao avaliar-se a epiderme com o método, sendo que a disseminação pagetoide descrita nestas lesões deve ser avaliada com cautela (59).

#### 2.2.5 Histopatologia do nevo recorrente:

Poucos estudos avaliaram objetivamente as características histológicas dos nevos recorrentes (1, 4, 9) (Quadro 1). Park *et al*, analisaram de maneira retrospectiva uma amostra de 175 lesões recorrentes e descreveram que estas apresentavam um aumento expressivo da atividade melanocítica juncional, sendo que mais da metade das lesões avaliadas apresentava um padrão histológico trizonal, constituído por um componente juncional lentiginoso sobre uma cicatriz dérmica, além da presença de células névicas dérmicas profundas residuais. O segundo padrão histológico mais comum, foi o de lesões melanocíticas com presença somente do componente juncional. Por último, a minoria destas lesões se apresentava com ninhos dérmicos associados à cicatriz, com ausência de atividade juncional (4).

A assimetria arquitetural (caracterizada pela diferença nos contornos, tamanho e forma dos ninhos de células melanocíticas, distribuição dos componentes intraepiteliais e dérmicos, e infiltrado inflamatório em relação às duas metades quando a lesão é dividida na porção central por um eixo imaginário vertical), foi descrita por Hoang *et al* na sua amostra de 15 NRs, como presente em cerca de metade das lesões recorrentes, sendo este achado raro nos nevos melanocíticos primários (9).

Cerca de um terço dos NRs demonstra “dropping off” das células névicas do

componente juncional para a cicatriz fibrosa que separa este dos ninhos remanescentes dérmicos profundos. Estas células permanecem com a característica de células “A”, não ocorrendo a diferenciação para células B ou C (4).

A presença de células névicas em disposição perifolicular ou invadindo estruturas anexiais é descrita, porém também este achado não foi encontrado de maneira mais proeminente do que nos nevos primários, sendo descrito em 6% das lesões da amostra de 357 NRs de King *et al* (1, 9). O comprometimento perineural é ausente nestas lesões (9).

A presença de melanófagos é mais acentuada nas lesões recorrentes quando comparadas às lesões névicas primárias (9). Com relação à inflamação, os NRs costumam exibir um infiltrado linfocítico dérmico superficial, discreto na maior parte das lesões, predominando na área cicatricial (4, 9).

Os NRs também apresentam em sua maioria um componente fibrótico, que costuma tornar-se mais proeminente conforme aumenta o tempo decorrente da excisão do nevo primário (4). Pode-se verificar também o aplanamento da epiderme, com perda da configuração epidérmica que dá origem ao padrão reticular dermatoscópico (1).

Outra característica marcante, importante na diferenciação com lesões melanocíticas de origem maligna, é a ausência/raridade de figuras mitóticas, na quase totalidade dos NRs (4). Quando se encontram mitoses, estas ocorrem no componente juncional, não sendo encontradas no componente névico dérmico da lesão (9).

A atipia melanocítica foi encontrada de maneira moderada em cerca de 12% das lesões analisadas, sendo a atipia intensa, não encontrada nos NRs (4). O achado de células névicas com maior tamanho e nucléolos mais proeminentes foi descrito como significativo quando comparado a nevos primários. Há uma tendência das células dos NRs também apresentarem núcleos maiores (9). King *et al* descreveram que o achado de atipia celular foi encontrado em algum grau em 26% da sua amostra (1). Estes achados se encontram presentes de maneira muito mais intensa nas lesões melanocíticas malignas.

A disseminação pagetoide, com tendência a ser discreta, pode ocorrer nos NRs, não sendo um achado proeminente. Os estudos existentes descrevem o encontro deste achado histológico de maneira discreta ou ausente em 89% das lesões, moderado em 8% delas e importante em somente 3% (4, 9).

O achado de células névicas do componente juncional apresentarem padrão de

células fusiformes foi raramente encontrado (4).

Nos NRs observa-se que os ninhos de melanócitos remanescentes se restringem do ponto de vista histológico aos limites da cicatriz de exérese da lesão primária contrastando com casos de melanoma onde o crescimento desorganizado neoplásico faz com que os ninhos extravasem as margens cirúrgicas (1, 4, 47).

Nota-se portanto, que uma pequena proporção dos NRs pode mimetizar histologicamente o melanoma de espalhamento superficial, apresentando atipia nuclear, crescimento lentiginoso proeminente, mitoses, envolvimento anaxial e infiltrado de células inflamatórias, sendo a diferenciação histológica entre as duas entidades por vezes difícil (1,4, 9).

#### 2.4 Imuno-histoquímica das lesões melanocíticas:

A imuno-histoquímica é uma ferramenta importante no diagnóstico histopatológico em diferentes áreas do conhecimento e, também, na dermatologia. Ela abrange um conjunto de técnicas nas quais, basicamente, anticorpos marcados são utilizados para detectar a presença de antígenos nas células e tecidos. Seu princípio consiste na capacidade de ligação específica destes anticorpos aos seus antígenos, sendo que a ligação pode ser visualizada quando o anticorpo é marcado com uma substância que produz cor (60).

Na maioria dos casos, a diferenciação entre os diversos tipos de lesões melanocíticas não necessita da utilização da técnica, entretanto, naqueles casos com histologia atípica, seu papel é de extrema importância (61).

A proteína S-100 é expressa em melanócitos, células gliais, condrócitos e células mioepiteliais das glândulas écrinas e apócrinas. Ela é o marcador mais sensível de proliferações melanocíticas, sendo encontrada em praticamente 100% dos nevos melanocíticos e em cerca de 98% dos melanomas (60). Observa-se que a imunomarcagem algumas vezes sofre interferência do processo laboratorial, como o tempo de fixação, congelamento prévio ou pré-tratamento com tripsina, sendo considerado realizar nova testagem naquelas lesões sugestivas de melanoma cuja marcação foi negativa para S-100 (62). A proteína perde em especificidade pois pode mais raramente também estar presente em outras neoplasias como alguns carcinomas espinocelulares, tumores mioepiteliais, tumores de músculo liso e tumores

da bainha nervosa dos nervos periféricos (60, 61). Como é um marcador presente tanto em lesões melanocíticas malignas como em benignas, sua imunomarcção não tem utilidade para a diferenciação entre elas, sendo seu uso reservado para os casos em que se tem dúvida quanto à origem melanocítica do tumor.

O marcador HMB-45 (*human melanoma black 45*) é um anticorpo monoclonal direcionado contra uma glicoproteína componente do premelanossoma (gp100), que identifica melanócitos ativos, imaturos e intradérmicos, não sendo marcador de melanócitos quiescentes (60, 62). Apresenta-se positivo em cerca de 78 a 93% dos casos de melanoma, e também é marcador de lesões melanocíticas benignas como nevos adquiridos, nevos de Spitz, nevos azuis e nevos displásicos (63). Tumores não melanocíticos que contenham premelanossomos, como o dermatofibrossarcoma protuberante pigmentado e o angiomiolipoma, também serão imunomarcados pelo HMB45, bem como lesões que contenham premelanossomos fagocitados em melanófagos ou transferidos para queratinócitos, como as ceratoses actínicas pigmentadas (62, 64). Este marcador, diferentemente do S-100, pode ter utilidade na diferenciação entre lesões melanocíticas benignas e malignas. É observado em lesões benignas que sua expressão diminui conforme há maturação das linhagens celulares com a sua profundidade, desta forma, apresenta um aspecto em forma de gradiente com o componente juncional mais intensamente marcado. Por outro lado, no melanoma, sua expressão continua aumentada também no componente profundo (62, 65). Uma exceção a este padrão de marcação acontece no melanoma desmoplásico, em que o HMB45 é encontrado com as características similares àquelas das lesões benignas, corando somente o componente intraepidérmico e juncional, e sendo negativo no componente dérmico (60). As metástases de melanoma também costumam apresentar-se positivas de maneira focal para este marcador (60, 63).

A tirosinase é uma enzima envolvida na biossíntese da melanina, sendo mais um marcador citoplasmático de alta sensibilidade e especificidade para lesões melanocíticas. Sua imunopositividade se correlaciona inversamente com o estágio clínico do melanoma. A coloração costuma ser mais homogênea nos estágios iniciais, tornando-se heterogênea nos estágios tardios. Assim como ocorre com a expressão de HMB45, marca-se em gradiente, com maior positividade epidérmica (66, 67).

O Melan-A é um componente da membrana do premelanossoma, produto do gene MART-1 (*melanoma antigen recognized by T cell 1*), apresentando sensibilidade

e especificidade semelhantes ao HMB45 para marcação de células melanocíticas (60, 64). Além das células melanocíticas cutâneas, se expressa nas células retinianas, ovarianas, nas células de Leydig do testículo e células do córtex da suprarrenal (60, 62). Cora-se de maneira mais difusa e mais intensa que a proteína S-100 (60). Algumas neoplasias melanocíticas não apresentam expressão deste marcador, tais como o melanoma desmoplásico e alguns melanomas de células fusiformes (60, 62). Na pele com dano actínico crônico, o Melan-A também pode estar expresso em queratinócitos basais pigmentados, por esta razão tem auxílio limitado na diferenciação de ceratose actínica pigmentada e lentigo maligno. Nestes casos, recomenda-se um painel imuno-histoquímico mais amplo com outros marcadores de linhagens melanocítica e queratinocítica (60, 66, 68).

O marcador Ki-67 é usado para identificar proliferação celular, não somente em lesões melanocíticas. Sua expressão nuclear é vista nas células que se encontram nas fases G1, M, G2 e S do ciclo celular, estando ausente na fase G0 (63, 69). Se por um lado, este marcador não é útil para caracterizar a lesão como de origem melanocítica, seu emprego é de grande utilidade na diferenciação entre lesões melanocíticas benignas e malignas, sendo sua expressão maior nos melanomas quando comparada aos nevos melanocíticos adquiridos (61, 70). Não há valor padronizado para determinar um ponto de corte entre melanoma e nevos, entretanto, a expressão de menos de 5% das células costuma ocorrer nas lesões melanocíticas benignas e, em níveis superiores, entre 10 a 30% nas células do melanoma (61, 66, 70). Além disto, as lesões melanocíticas benignas exibem a sua marcação na região junção dermoepidérmica e porções superficiais da derme, enquanto os melanomas exibem positividade nas margens profundas da lesão (62, 70). Sua avaliação deve ser cuidadosa, tendo-se em vista que a sua expressão pode também estar presente em queratinócitos basais, células que normalmente também apresentam alto índice proliferativo (66).

A proteína nuclear MiTF-1 (*Microphthalmia transcription factor 1*) atua no desenvolvimento embriológico de melanócitos e na regulação da síntese da melanina, sendo expressa na maioria das lesões melanocíticas, e considerada de pouca especificidade por positivar também em diversas outras células como macrófagos, linfócitos, fibroblastos, músculo liso e células de Schwann (60, 62). Apresenta alta sensibilidade, e por tratar-se de um marcador nuclear, sua interpretação é mais fácil comparativamente aos outros marcadores melanocíticos com imunomarcação

citoplasmática (60, 66). Apresenta utilidade também no diagnóstico de metástases de melanoma, sendo sua positividade observada em cerca de 88% destas lesões (60, 63). Não apresenta boa sensibilidade na marcação do melanoma desmoplásico, sendo negativo na maioria destas lesões (71).

Sox-10 é um fator de transcrição da crista neural envolvido na diferenciação e maturação das células tronco em células de Schwann e melanócitos (60, 72). O anticorpo anti-Sox-10 marca as neoplasias melanocíticas tanto benignas quanto malignas, além de neoplasias das células de Schwann e tumores neuroectodérmicos (60). Por ter expressão nuclear e marcação difusa, a sua avaliação é mais fácil do que a de outros marcadores de linhagem melanocítica (60, 61, 72). Sua grande importância reside na marcação de melanomas desmoplásicos, tendo em vista que estes tumores frequentemente não coram para anticorpos altamente específicos dos melanomas convencionais como Melan-A, MITF e HMB45. Faz a diferenciação do melanoma desmoplásico com outros tumores de células fusiformes, além de auxílio no diagnóstico quanto à recidiva destas lesões em cicatrizes pigmentadas, que podem exibir fibroblastos e histiócitos imaturos mimetizando histologicamente células melanocíticas (60, 61, 72, 73). Frequentemente estes fibroblastos e histiócitos apresentam-se positivos para S100, sendo a negatividade para SOX-10 dado importante para acurácia diagnóstica (73). Seu uso em conjunto com outros marcadores, como o S-100 e o MiTF1, também apresenta utilidade na imunomarcação de metástases de melanoma, que tendem a apresentar maior negatividade para S-100 que os tumores primários (66).

Finalmente, lesões melanocíticas duvidosas na análise clínica e/ou histopatológica tem na imuno-histoquímica um aliado diagnóstico. Nestes casos, se impõe a realização de painéis com alguns destes marcadores acima combinados. O diagnóstico definitivo neste cenário se baseia na interpretação conjunta do padrão de expressão dos marcadores e nos dados clínicos e histológicos da lesão (62).

#### 2.4.1 Imuno-histoquímica dos nevos recorrentes:

Alguns nevos melanocíticos recorrentes podem simular histologicamente o melanoma, sendo a imuno-histoquímica a ferramenta capaz de auxiliar nesta diferenciação. Infere-se que a imunomarcação dos NRs se comporte como nos nevos



adquiridos.

Hoang *et al*, analisando 15 NRs, descreveram que sua amostra foi 100% positiva para S-100 e Melan-A/MART-1, sendo a marcação homogênea tanto no componente juncional como no dérmico. Diferentemente, a marcação para HMB45 e tirosinase se apresentou em gradiente, com progressiva diminuição na intensidade e número de células marcadas conforme houve um afastamento em relação ao componente juncional em direção à derme profunda (9). O marcador proliferativo KI-67 foi positivo em 4,6% das células névicas juncionais e em somente 0,93% das células névicas dérmicas, achado compatível com lesões melanocíticas benignas (9).

O Marcador KI-67 foi analisado de maneira isolada em outra amostra, evidenciando o mesmo índice proliferativo nas porções do nevo residual dérmico e juncional recidivado (10).

### 2.5 Mutação de BRAF:

As mutações ativadoras do BRAF (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*), um protooncogene da família das serina-treonina quinases que regula o crescimento celular, são encontradas com frequência em diversas neoplasias como o melanoma, carcinoma papilar de tireóide, carcinoma colorretal, carcinoma ovariano, leucemia de células pilosas, carcinomas de vias biliares, adenocarcinomas pulmonares, entre outras (74, 75). Estima-se que cerca de 5-7% de todas as neoplasias em humanos apresente alguma mutação neste gene, sendo a substituição do aminoácido valina pelo ácido glutâmico, no códon 600 (V600E), a mutação mais frequente, correspondendo a cerca de 95% dos casos (74, 76, 77). A presença desta mutação também é descrita em tumores benignos como os nevos melanocíticos e pólipos intestinais, acreditando-se que esta seja uma etapa precoce na gênese tumoral (74).

A mutação de BRAF é considerada um evento inicial em cerca de 50-60% dos casos de melanoma, sendo mais prevalente nos melanomas de espalhamento superficial, ocorrendo mais em pacientes jovens com pouco dano actínico e em menor quantidade naqueles localizados na região de cabeça e pescoço (61, 76, 78). Sua identificação tem grande utilidade para o planejamento terapêutico naqueles casos



com doença avançada, onde o uso de drogas inibidoras do BRAF como o vemurafenibe e o dabrafenibe estão disponíveis para uso (61, 76).

A mutação de BRAF pode ser detectada classicamente por meio de sequenciamento gênico, e mais recentemente por meio de marcação imunohistoquímica, método de menor custo, mais rápida execução e mais fácil interpretação (76). Análises comparativas dos dois métodos demonstraram que o imunomarcador VE1 anti-BRAF-V600E é altamente sensível (85-100%) e específico (94-100%) quando comparado a métodos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em identificar esta mutação em linhagens tumorais, já tendo sido avaliado comparativamente também em melanomas (61, 74, 76, 79, 80).

#### 2.5.1 Mutação de BRAF nos nevos melanocíticos:

A avaliação da presença da mutação de BRAF V600E em nevos melanocíticos, demonstrou-se positiva na maioria das lesões, sendo a prevalência descrita entre 57 e 87,5%, acreditando-se que este seja um evento inicial também na nevogênese (11, 12).

A relação de sua expressão com a exposição solar já foi avaliada, não se demonstrando aparentemente uma relação de causa e efeito entre elas (81, 82, 83).

Ichii-Nakato *et al*, por meio de análise de sequência de DNA corroboraram com esta idéia. Descreveram taxas de mutação de BRAF de 84,4% em nevos localizados em áreas de exposição solar crônica e de 81,4% naqueles localizados em áreas fotoprotetidas, sugerindo pelas taxas similares, que a exposição à radiação ultravioleta (RUV) não é fator determinante para aquisição da mutação, sendo talvez relevante em outras etapas do processo tumoral (81). Ainda em relação à exposição à RUV, Karram *et al*, avaliaram a prevalência da mutação nas células névicas em relação a áreas geográficas com distintas incidências solares, localizações anatômicas diversas dos nevos e dano solar crônico cumulativo cutâneo medido pelo grau de elastose solar, não achando dados que sustentem o papel relevante da exposição à RUV como fator promotor da mutação (82). Especula-se que a RUV possa estar envolvida na nevogênese por “assinaturas” mutacionais específicas e por outros mecanismos mais complexos. Dentre eles, induzindo diretamente a proliferação dos melanócitos pela ativação de receptores de fatores de crescimento

localizados na superfície celular, por meio do estresse oxidativo, e poderia ativar o receptor de melanocortina 1, induzindo o crescimento dos melanócitos, e por fim a exposição à RUV também teria a capacidade de regular positivamente a produção de fatores de crescimento como a endotelina-1 e o fator de crescimento derivado dos fibroblastos (81).

Ainda em nevos, estudos apontam para uma correlação de algumas características histológicas e dermatoscópicas das lesões névicas com a presença da mutação BRAF V600E. A imunomarcagem é significativamente maior nos nevos de padrão dermatoscópico globular quando comparados aos reticulares (84, 85). Este achado é compatível com as diferenças em relação à presença da mutação descritas nos diversos subtipos histológicos, sendo demonstrada maior positividade nas lesões com ninhos dérmicos quando comparadas aos nevos juncionais, cujo componente névico localiza-se na junção dermoepidérmica (14, 82, 84, 85, 86, 87).

Diferenças na imunomarcagem com BRAF relacionadas à idade dos pacientes cujos nevos foram estudados, não foram significativas na maioria dos trabalhos (81, 85). Por outro lado, Karram *et al* acharam significância em relação à idade, sendo os nevos de pacientes mais idosos mais frequentemente mutados para BRAF na sua amostra, indo de encontro à informação sobre as características dermatoscópicas mais prevalentes, tendo em vista que nevos de padrão globular tendem a estar mais presentes em pacientes jovens (82). Desta maneira, ainda é controversa a relação entre a mutação de BRAF e a faixa etária dos pacientes.

Ainda sobre a influência da mutação de BRAF em nevos adquiridos, foram descritas alterações dermatoscópicas em mais da metade dos nevos melanocíticos de pacientes em uso de vemurafenibe, inibidor seletivo do BRAF V600E, sendo que o achado mais encontrado foi o aparecimento ou desaparecimento de glóbulos, eventos provavelmente secundários à inibição ou ativação da via da MAPK/ERK, dependente da presença ou ausência da mutação névica de BRAF (84, 88).

Quando pacientes com múltiplos nevos excisados foram analisados para a mutação de BRAF, em alguns estudos, revelaram uma predisposição a demonstrar em todos os seus nevos o mesmo status para a mutação, sugerindo uma provável predisposição genética envolvida na promoção da mesma (82, 89). Esta predisposição não foi confirmada em todas as séries analisadas (90).

A avaliação de nevos congênitos para a mutação de BRAF V600E, não mostrou dados significativamente diferentes daqueles encontrados nos nevos adquiridos (12,

83, 89). Descreveu-se que a prevalência da mutação se assemelha a dos nevos adquiridos naqueles nevos melanocíticos de tamanho pequenos (<1,5 cm), sendo significativamente diminuída naqueles considerados médios (entre 1,5 e 20 cm), e raramente encontrada nos gigantes (>20 cm). Os nevos maiores tendem a apresentar mais a mutação de NRAS (91, 92, 93).

Os nevos displásicos, quando avaliados isoladamente, apresentam a mutação em BRAF com prevalência média ao redor de cerca de 60%, assemelhando-se aos nevos adquiridos comuns (90, 91). Já os nevos azuis, apresentam baixa prevalência desta mutação, corroborando a sua natureza melanocítica distinta (91, 94). Por último, os nevos de Spitz apresentam a mesma característica dos nevos azuis, sendo a mutação de BRAF achado pouco prevalente (91).

Até este momento, não encontramos estudos avaliando a presença desta mutação em NRs.

Quadro 1: Resumo das características histológicas dos nevos melanocíticos recorrentes elaborado a partir dos principais estudos realizados até o momento.

<b>Características histológicas</b>	<b>Park <i>et al.</i> (4) n=175</b>	<b>Hoang <i>et al.</i> (9) n=15</b>	<b>King <i>et al.</i> (1) n=357</b>
Envolvimento anexial	45/175 (26%)	1/15 (7%)	20/357 (6%)
Atipia nuclear	73/175 (42%)*	12/15 (80%)**	93/357 (26%)
Mitoses ***	14/175 (8%)	1/15 (7%)	NA
Hiperplasia lentiginosa	129/175 (74%)	NA	303/357 (85%)
Hiperplasia lentiginosa proeminente	61/175 (35%)		
Disseminação pagetoide	63/175 (36%)	2/15 (13%)	20/357 (6%)
Inflamação	136/175 (78%)	10/15 (67%)	46/357 (13%)
Inflamação proeminente	28/175 (16%)		22/357 (6%)
Fibrose	164/175 (94%)	15/15 (100%)	NA
Assimetria arquitetural	NA	7/15 (47%)	NA
Envolvimento perineural	NA	0/15 (0%)	NA
Melanófagos	NA	11/11 (100%)	NA
Padrão confluyente	NA	NA	7/357 (2%)
“Dropping off” das células névicas ****	63/175 (36%)	NA	NA

NA= não avaliado

\* Considerada de baixo grau na maioria das lesões.

\*\*Atipia nuclear de alto grau não foi encontrada em nenhuma lesão.

\*\*\* Somente no componente juncional.

\*\*\*\* Descrito como a “queda” de células névicas da junção dermoepidérmica para a cicatriz fibrótica, mantendo a configuração de células A.

### 3. Marco conceitual

A maioria dos nevos recorrentes apresenta características clínicas e dermatoscópicas que possibilitam o seu inequívoco diagnóstico. Uma parte destas lesões, porém, apresenta achados que se sobrepõem aos de lesões melanocíticas malignas, sendo necessário a avaliação histopatológica e por vezes a avaliação da expressão de marcadores imuno-histoquímicos para o correto diagnóstico das mesmas.

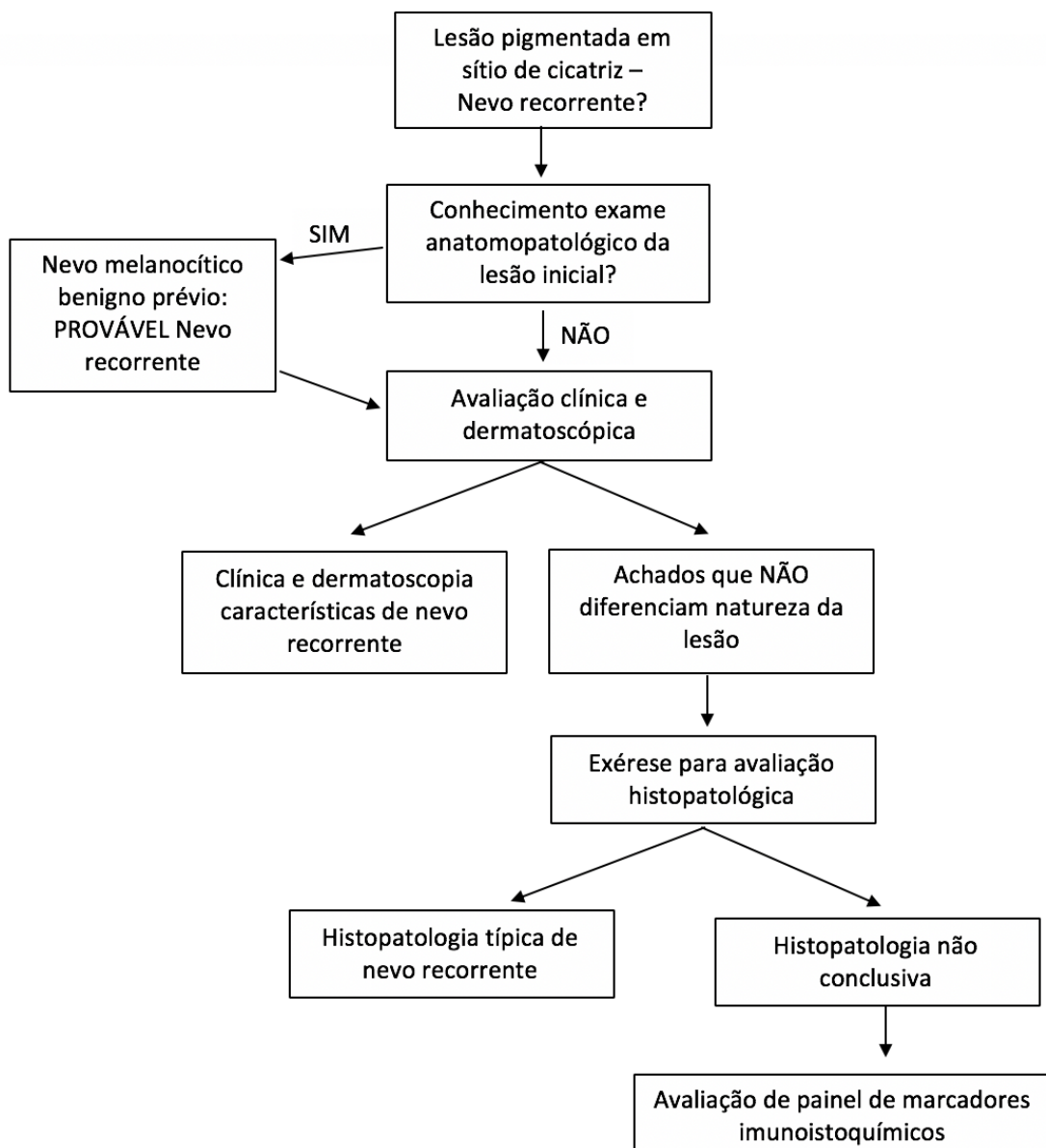


Figura 2. Marco conceitual: processo diagnóstico dos nevos melanocíticos recorrentes.

#### 4. Justificativa

Lesões melanocíticas recorrentes podem constituir-se um desafio diagnóstico na prática diária dermatológica. A recidiva de nevos melanocíticos não é evento incomum, principalmente quando a remoção da lesão primária é feita pela técnica de exérese tangencial, amplamente utilizada devido ao bom resultado estético da mesma.

Sabendo-se que os nevos recorrentes podem mimetizar clinicamente e dermatoscopicamente o melanoma de espalhamento superficial, o estudo da caracterização histopatológica e imuno-histoquímica destas lesões se faz pertinente, tendo em vista ainda a sua escassa abordagem na literatura. O adequado diagnóstico destas lesões benignas, evita abordagens cirúrgicas e clínicas mais agressivas.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo principal:

Avaliar as características histológicas e a expressão imuno-histoquímica de HMB-45, tirosinase, Ki-67 e BRAF em uma amostra de nevos melanocíticos recorrentes.

### 5.2 Objetivos secundários:

Verificar associação da expressão imuno-histoquímica de BRAF dos nevos recorrentes com as seguintes características clínicas do paciente:

- sexo
- idade
- fototipo

Verificar associação da expressão imuno-histoquímica de BRAF dos nevos recorrentes com a localização anatômica da lesão primária: áreas fotoexpostas e áreas não fotoexpostas.

Verificar associação da expressão imuno-histoquímica de BRAF dos nevos recorrentes e as seguintes características dermatoscópicas de suas lesões primárias:

- padrão global
- presença de pontos
- presença de glóbulos
- presença de estruturas vasculares
- presença de pelo terminal
- número de cores
- presença de áreas sem estruturas
- presença de pigmentação anular

## 6. Referências bibliográficas da revisão da literatura

- 1- King R, Hayzen BA, Page RN, Googe PB, Zeagler D, Mihm MC Jr. Recurrent nevus phenomenon: a clinicopathologic study of 357 cases and histologic comparison with melanoma with regression. *Mod Pathol*. 2009; 22(5): 611–617.
- 2- Heck R, Ferrari T, Cartell A, Bakos RM. Clinical and dermoscopic (in vivo and ex vivo) predictors of recurrent nevi. *Eur J Dermatol*. 2019; 29(2): 179–184.
- 3- Kelly JW, Shen S, Pan Y, Dowling J, McLean CA. Postexcisional melanocytic regrowth extending beyond the initial scar: a novel clinical sign of melanoma. *Br J Dermatol*. 2014;170(4):961–964.
- 4- Park HK, Leonard DD, Arrington JH, Lund HB. Recurrent melanocytic nevi: Clinical and histologic review of 175 cases. *J Am Acad Dermatol*. 1987;17(2):285-92.
- 5- Botella-Estrada R, Nagore E, Sopena J, Cremades A, Alfaro A, Sanmartin O, et al. Clinical, dermoscopy and histological correlation study of melanotic pigmentations in excision scars of melanocytic tumours. *Br J Dermatol*. 2006;154(3):478–484.
- 6- Tschandl P. Recurrent nevi: report of three cases with dermatoscopic-dermatopathologic correlation. *Dermatol Pract Concept*. 2013;3(1):29–32.
- 7- Moscarella E, Argenziano G, Lallas A, Longo C, Al Jalbout S, Zalaudek I. Pigmentation in a scar: use of dermoscopy in the management decision. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69(3):e115–e116.
- 8- Blum A, Hofmann-Wellenhof R, Marghoob AA, Argenziano G, Cabo H, Carrera C, et al. Recurrent melanocytic nevi and melanomas in dermoscopy: results of a multicenter study of the International Dermoscopy Society. *JAMA Dermatol*. 2014;150(2):138–145.
- 9- Hoang MP, Prieto VG, Burchette JL, Shea CR. Recurrent melanocytic nevus: a histologic and immunohistochemical evaluation. *J Cutan Pathol*. 2001;28(8):400-406.
- 10- King R, Ziegler D, Page RN, Mihm MC Jr, Googe PB. Persistent melanocytic nevus phenomenon: a clinicopathologic study of 328 patients. *J Cutan Pathol*. 2005; 32: 98.
- 11- Yeh I, Deimling A, Bastian BC. Clonal BRAF Mutations in Melanocytic Nevi and Initiating Role of BRAF in Melanocytic Neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105:917–919.
- 12- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*. 2003;33(1):19–20.



13- Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2011;164(4):776–784.

14- Tan JM, Tom LN, Soyer HP, Stark MS. Defining the Molecular Genetics of Dermoscopic Naevus Patterns. *Dermatology*. 2019;235(1):19-34.

15- Unna PG. Naevi und Naevocarcinome. *Berliner Klin Wochenschr* 1893; 30:14–16.

16- Krengel S. Nevogenesis--new thoughts regarding a classical problem. *Am J Dermatopathol*. 2005;27(5):456–465

17- Zalaudek I, Grinschgl S, Argenziano G, Marghoob AA, Blum A, Richtig E, et al. Age-related prevalence of dermoscopy patterns in acquired melanocytic naevi. *Br J Dermatol*. 2006;154(2):299–304.

18- Worret WI, Burgdorf WH. Which direction do nevus cells move? Abtropfung reexamined. *Am J Dermatopathol*. 1998;20(2):135–139.

19- Masson P. My conception of cellular nevi. *Cancer*. 1951;4(1):9–38.

20- Cramer SF. The histogenesis of acquired melanocytic nevi: based on a new concept of melanocytic differentiation. *Am J Dermatopathol*. 1984; 6:289–298.

21- Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, Szeder V. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev Dyn*. 2004;231(2):258–269.

22- Zalaudek I, Hofmann-Wellenhof R, Kittler H, Argenziano G, Ferrara G, Petrillo L, et al. A dual concept of nevogenesis: theoretical considerations based on dermoscopic features of melanocytic nevi. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2007;5(11):985–992.

23- Charbel C, Fontaine RH, Kadlub N, Coulomb-L'Hermine A, Rouille T, How-Kit A, et al. Clonogenic cell subpopulations maintain congenital melanocytic nevi. *J Invest Dermatol*. 2015;135(3):824–833.

24- Nishikawa-Torikai S, Osawa M, Nishikawa S. Functional characterization of melanocyte stem cells in hair follicles. *J Invest Dermatol*. 2011;131(12):2358–2367.

25- Cramer SF, Fesyuk A. On the development of neurocutaneous units--implications for the histogenesis of congenital, acquired, and dysplastic nevi. *Am J Dermatopathol*. 2012;34(1):60–81.

26- Walton RG, Sage RD, Farber EM. Electrodesiccation of pigmented nevi; biopsy studies: a preliminary report. *AMA Arch Derm*. 1957;76(2):193–199.

- 27- Fox JC, Reed JA, Shea CR. The recurrent nevus phenomenon: a history of challenge, controversy, and discovery. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(7):842–846.
- 28- Kornberg R, Ackerman AB. Pseudomelanoma: recurrent melanocytic nevus following partial surgical removal. *Arch Dermatol* 1975; 111(12):1588-90.
- 29- Adeniran AJ, Prieto VG, Chon S, Duvic M, Diwan AH. Atypical histologic and immunohistochemical findings in melanocytic nevi after liquid nitrogen cryotherapy. *J Am Acad Dermatol* 2009; 61(2): 341-45.
- 30- Hwang K, Lee WJ, Lee SI. Pseudomelanoma after laser therapy. *Ann Plast Surg* 2002; 48:562–564.
- 31- Dwyer CM, Kerr RE, Knight SL, Walker E. Pseudomelanoma after dermabrasion. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28:263-4.
- 32- Lee HW, Ahn SJ, Lee MW, Choi JH, Moon KC, Koh JK. Pseudomelanoma following laser therapy. *JEADV* 2006; 20:341–362.
- 33- Gotkin R, Sarnoff D, Saini R. Pseudomelanoma following fractional co2 laser resurfacing. *Lasers Surg Med* 2011; 43:934-934.
- 34- Guida S, Bencini PL, Manganoni AM, Gianotti R, Lospalluti L, Greco P, et al. Recurrence of melanocytic lesions after laser treatment: benign vs. malignant upon dermoscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017;31(12):e526–e528.
- 35- Arpaia N, Cassano N, Vena GA. Melanocytic Nevus with Atypical Dermoscopic Features at the Site of Radiodermatitis. *Dermatol Surg* 2006; 32:100–102.
- 36- Fening K, Theos A, Andea A, Vincent B, Busam K, McKay K. Epidermolysis bullosa nevus in a patient with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: a case report. *Am J Dermatopathol*. 2014;36(12):194–197.
- 37- Noor O, Elston D, Flamm A, Hall LD, Cha J. A recurrent melanocytic nevus phenomenon in the setting of Hailey-Hailey disease. *J Cutan Pathol*. 2015;42(8):574–577.
- 38- Araujo RN, Araújo MK, Piñeiro-Maceira J, Barcaui CB. Recurrent Nevus After Burn Injury. *Dermatol Pract Concept*. 2019;9(2):165–167.
- 39- Bong JL, Perkins W. Shave excision of benign facial melanocytic naevi: a patient's satisfaction survey. *Dermatol Surg*. 2003; 29: 227–9.
- 40- Ferrandiz L, Moreno-Ramirez D, Camacho FM. Shave excision of common acquired melanocytic nevi: cosmetic outcome, recurrences, and complications. *Dermatol Surg*. 2005; 31: 1112–5.

- 41- Gambichler T, Senger E, Rapp S, Alamouti D, Altmeyer P, Hoffmann K. Deep shave excision of macular melanocytic nevi with the razor blade biopsy technique. *Dermatol Surg.* 2000; 26: 662–6.
- 42- Vilain RE, McCarthy SW, Scolyer RA. The regenerating naevus. *Pathology.* 2016;48(2):108–112.
- 43- Gougerot H. Recidive des naevi, apres destruction, dans le meme type, dans la meme forme, dans la meme etendue. *Monde Med.* 1947;57(12):50.
- 44- Schoenfeld RJ, Pinkus H. The recurrence of nevi after incomplete removal. *AMA Arch Derm.* 1958;78(1):30–35.
- 45- Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature.* 2002;416(6883):854–860.
- 46- Cox AJ, Walton RG. The induction of junctional changes in pigmented nevi. *Arch Pathol.* 1965; 79:428–434.
- 47- Arrese Estrada J, Piérard-Franchimont C, Piérard GE. Histogenesis of recurrent nevus. *Am J Dermatopathol.* 1990;12(4):370–372.
- 48- Sommer LL, Barcia SM, Clarke LE, Helm KF. Persistent melanocytic nevi: a review and analysis of 205 cases. *J Cutan Pathol.* 2011;38(6):503–507.
- 49- Longo C, Moscarella E, Pepe P, Cesinaro AM, Casari A, Manfredini M, et al. Confocal microscopy of recurrent naevi and recurrent melanomas: a retrospective morphological study. *Br J Dermatol* 2011;165(1):61–68.
- 50- Harvell JD, Bastian BC, LeBoit PE. Persistent (Recurrent) Spitz Nevi. *Am J Surg Pathol.* 2002; 26(5): 654–661.
- 51- Harvell J, White WL. Persistent and Recurrent Blue Nevi. *Am J Dermatopathol.* 1999; 21(6):506-17
- 52- Grin CM, Friedman KP, Grant-Kels JM. Dermoscopy: a review. *Dermatol Clin.* 2002; 20(4):641-6.
- 53- Mogensen M, Jemec GB. Diagnosis of Nonmelanoma Skin Cancer/Keratinocyte Carcinoma: A Review of Diagnostic Accuracy of Nonmelanoma Skin Cancer Diagnostic Tests and Technologies. *Dermatol Surg.* 2007; 33:1158–1174.
- 54- Binder M, Puespoeck-Schwarz M, Steiner A, Kittler H, Muellner M, Wolff K, et al. Epiluminescence microscopy of small pigmented skin lesions: Short-term formal training improves diagnostic performance of dermatologists. *J Am Acad Dermatol.* 1997; 36:197-202.

55- Pellacani G, Longo C, Malvehy J, Puig S, Carrera C, Segura S, et al. In Vivo Confocal Microscopic and Histopathologic Correlations of Dermoscopic Features in 202 Melanocytic Lesions. *Arch Dermatol*. 2008;144(12):1597-1608.

56- Porto AC, Blumetti TP, Castro RPR, Pinto CAL, Mendes ASP, Dupra Neto JP, et al. Recurrent halo nevus: Dermoscopy and confocal microscopy features. *JAAD Case Rep*. 2017;3(3):256–258.

57- Ludzik J, Witkowski AM, Pellacani G. Pseudomelanoma follow-up of a recurrent naevus with dermoscopy and reflectance confocal microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;30(4):718–719.

58- Yélamos O, Jain M, Busam KJ, Marghoob AA. Recurrent nevus as a pitfall of melanoma diagnosis under reflectance confocal microscopy. *Australas J Dermatol*. 2018;59(3):227–229.

59- Hashemi P, Pulitzer MP, Scope A, Kovalyshyn I, Halpern AC, Marghoob AA. Langerhans cells and melanocytes share similar morphologic features under in vivo reflectance confocal microscopy: a challenge for melanoma diagnosis. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66(3):452–462.

60- Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part I). *Actas Dermosifiliogr*. 2013 Mar;104(2):99-127.

61- Chatterjee D, Bhattacharjee R. Immunohistochemistry in Dermatopathology and its Relevance in Clinical Practice. *Indian Dermatol Online J*. 2018;9(4):234–244.

62- Prieto VG, Shea CR. Use of immunohistochemistry in melanocytic lesions. *J Cutan Pathol*. 2008;35(2):1–10.

63- Hoang MP, Mahalingam M, Selim MA. Immunohistochemistry in the diagnosis of cutaneous neoplasms. *Future Oncol*. 2010;6(1):93–109.

64- Folpe AL, Cooper K. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: pleomorphic cutaneous spindle cell tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(10):1517–1524.

65- Compton LA, Murphy GF, Lian CG. Diagnostic Immunohistochemistry in Cutaneous Neoplasia: An Update. *Dermatopathology*. 2015;2(1):15–42.

66- Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part II). *Actas Dermosifiliogr*. 2013;104(3):181–203.

67- Hofbauer GF, Kamarashev J, Geertsen R, Böni R, Dummer R. Tyrosinase immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *J Cutan Pathol*. 1998;25(4):204–209.

68- El Shabrawi-Caelen L, Kerl H, Cerroni L. Melan-A: not a helpful marker in distinction between melanoma in situ on sun-damaged skin and pigmented actinic keratosis. *Am J Dermatopathol*. 2004;26(5):364–366.

69- Nielsen PS, Riber-Hansen R, Jensen TO, Schmidt H, Steiniche T. Proliferation indices of phosphohistone H3 and Ki67: strong prognostic markers in a consecutive cohort with stage I/II melanoma. *Mod Pathol*. 2013;26(3):404–413.

70- Rudolph P, Schubert C, Schubert B, Parwaresch R. Proliferation marker Ki-S5 as a diagnostic tool in melanocytic lesions. *J Am Acad Dermatol*. 1997;37(2 Pt 1):169–178.

71- King R, Gooze PB, Weilbaecher KN, Mihm MC Jr, Fisher DE. Microphthalmia transcription factor expression in cutaneous benign, malignant melanocytic, and nonmelanocytic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(1):51–57.

72- Palla B, Su A, Binder S, Dry S. SOX10 expression distinguishes desmoplastic melanoma from its histologic mimics. *Am J Dermatopathol*. 2013;35(5):576–581.

73- Ramos-Herberth FI, Karamchandani J, Kim J, Dadras SS. SOX10 immunostaining distinguishes desmoplastic melanoma from excision scar. *J Cutan Pathol*. 2010;37(9):944–952.

74- Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, Schindler G, et al. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol*. 2011; 122:11-19.

75- Routhier CA, Mochel MC, Lynch K, Dias-Santagata D, Louis DN, Hoang MP. Comparison of 2 monoclonal antibodies for immunohistochemical detection of BRAF V600E mutation in malignant melanoma, pulmonary carcinoma, gastrointestinal carcinoma, thyroid carcinoma, and gliomas. *Hum Pathol*. 2013; 44:2563-2570.

76- Anwar MAF, Murad F, Dawson E. Immunohistochemistry as a reliable method for detection of BRAF-V600E mutation in melanoma: a systematic review and meta-analysis of current published literature. *J Surg Res*. 2016; 203: 407-15.

77- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949–954.

78- Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2011;164(4):776–784.

79- Pearlstein MV, Zedek DC, Ollila DW, Treece A, Gulley ML, Groben PA, et al. Validation of the VE1 immunostain for the BRAF V600E mutation in melanoma. *J Cutan Pathol*. 2014;41(9):724–732.

80- Just PA, Audebourg A, Pasmant E, Clauser E, Carlotti A, Laurent S, et al. Immunohistochemistry versus next-generation sequencing for the routine detection of BRAF V600E mutation in melanomas. *Hum Pathol*. 2014;45(9):1983–1984.

81- Ichii-Nakato N, Takata M, Takayanagi S, Takashima S, Lin J, Murata H, et al. High frequency of BRAFV600E mutation in acquired nevi and small congenital nevi, but low frequency of mutation in medium-sized congenital nevi. *J Invest Dermatol*. 2006;126(9):2111–2118.

82- Karram S, Novy M, Saroufim M, Loya A, Taraif S, Houreih MA, et al. Predictors of BRAF mutation in melanocytic nevi: analysis across regions with different UV radiation exposure. *Am J Dermatopathol*. 2013;35(4):412–418.

83- Wu J, Rosenbaum E, Begum S, Westra WH. Distribution of BRAF T1799A(V600E) mutations across various types of benign nevi: implications for melanocytic tumorigenesis. *Am J Dermatopathol*. 2007;29(6):534–537.

84- Marchetti MA, Kiuru MH, Busam KJ, Marghoob AA, Scope A, Dusza SW, et al. Melanocytic naevi with globular and reticular dermoscopic patterns display distinct BRAF V600E expression profiles and histopathological patterns. *Br J Dermatol*. 2014 Nov;171(5):1060–5.

85- Zalaudek I, Guelly C, Pellacani G, Hofmann-Wellenhof R, trajanoski S, Kittler K, et al. The dermoscopic and histopathological patterns of nevi correlate with the frequency of BRAF mutations. *J Invest Dermatol*. 2011;131(2):542–545.

86- Hafner C, Stoehr R, Van Oers JM, Zwarthoff EC, Hofstaedter F, Klein C, et al. The absence of BRAF, FGFR3, and PIK3CA mutations differentiates lentigo simplex from melanocytic nevus and solar lentigo. *J Invest Dermatol*. 2009; 129(11):2730–5.

87- Kiuru M, Tartar DM, Qi L, Chen D, Yu L, Konia T, et al. Improving classification of melanocytic nevi: Association of BRAF V600E expression with distinct histomorphologic features. *J Am Acad Dermatol*. 2018;79(2):221–229.

88- Perier-Muzet M, Thomas L, Poulalhon N, Debarbieux S, Bringuier PP, Duru G, et al. Melanoma patients under vemurafenib: prospective follow-up of melanocytic lesions by digital dermoscopy. *J Invest Dermatol*. 2014;134(5):1351–1358.

89- Qi RQ, He L, Zheng S, Hong Y, Ma L, Zhang S, et al. BRAF exon 15 T1799A mutation is common in melanocytic nevi, but less prevalent in cutaneous malignant melanoma, in Chinese Han. *J Invest Dermatol*. 2011;131(5):1129–1138.

90- Saroufim M, Novy M, Taraif S, Habib RH, Loya A, Rauscher B, et al. BRAF mutational epidemiology in dysplastic nevi: does different solar UV radiation exposure matter? *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28(5):615–625.

91- Roh MR, Eliades P, Gupta S, Tsao H. Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015;28(6):661–672.

92- Wu D, Wang M, Wang X, Mihn MC, Googe PB. Lack of BRAF(V600E) mutations in giant congenital melanocytic nevi in a Chinese population. *Am J Dermatopathol*. 2011;33(4):341–344.

93- Charbel C, Fontaine RH, Malouf GG, Picard A, Kadlub N, El-Murr N, et al. NRAS mutation is the sole recurrent somatic mutation in large congenital melanocytic nevi. *J Invest Dermatol*. 2014;134(4):1067–1074.

94- Saldanha G, Purnell D, Fletcher A, Potter L, Gillies A, Pringle JH. High BRAF mutation frequency does not characterize all melanocytic tumor types. *Int J Cancer*. 2004;111(5):705–710.



## 7. Artigo em inglês

### 7.1 TITLE

The histopathological aspects and BRAF immunohistochemical expression in recurrent melanocytic nevi

### 7.2 ABSTRACT

#### Background:

A recurrent nevus is a pigmented lesion occurring at the site of removal of a previous benign melanocytic nevus. There are well-known clinical and dermoscopic aspects already described for these lesions, however studies that assess their histopathological and immunohistochemical features are scarce and little is also known regarding their pathophysiological mechanisms.

#### Objectives:

To evaluate the histological and immunohistochemical features of a sample of recurrent melanocytic nevi, and the association of the immunohistochemical expression of BRAF in these nevi with clinical and dermatoscopic predictors for recurrence evaluated retrospectively in their primary lesions.

#### Methods:

A cross-sectional study, with a sample of 58 recurrent nevi (RNs) were evaluated for their histological features. In addition, the immunohistochemical expression of HMB-45, tyrosinase, KI-67 and BRAF-V600E in the lesions was evaluated. Finally, we looked at the association of the immunohistochemical expression of BRAF in the recurrent nevi with clinical and dermoscopic aspects of their primary lesions.

#### Results:

A trizonal pattern was found in 84% of the lesions. Most RNs presented architectural asymmetry (56%) and lentiginous hyperplasia (76%). Fibrosis (98%) and inflammation (96%) were found in almost the entire sample. Uncommon findings were the confluence of junctional nests (12%) and the “dropping off” of nevus cells into the dermal scar (1.7%). Melanophages were found in 79%, and adnexal involvement by nevus cells in 22% of the cases. We found no perineural involvement or mitosis in any



of the evaluated lesions. Pagetoid spread and cell atypia, were found to be slight to moderate in 30% and 15% of the lesions, respectively.

The immunohistochemical analysis showed graded expression of positive immunostaining for HMB-45 (98%) and tyrosinase (91%). KI-67 exhibited an average proliferative index of 2.83%, almost exclusively in the junctional component.

The BRAF expression was found to be positive in 42 NRs (72.4%). It occurred exclusively in the junctional portion in 7 lesions, in the dermal portion in 28 and in both locations in 7 lesions. Moreover, BRAF positive expression was associated to the location in sunexposed areas ( $p = 0.01$ ), and for the dermoscopic presence of annular hyperpigmentation ( $p = 0.041$ ).

### Conclusion:

We have demonstrated that the most common histopathologic pattern of recurrent nevi is composed of a trizonal pattern associated with architectural asymmetry. Other common histological findings include lentiginous hyperplasia, fibrosis, inflammation, absence of mitosis and absence of cell atypia. We also demonstrated by Ki 67 expression that these lesions have a low proliferative rate and that HMB-45 and tyrosinase expressions demonstrate a gradient pattern. Moreover, we observed that BRAF expression positivity is high among recurrent nevi, occurring independently in the junctional and dermal portions of the nevi. Finally, it seems that this expression is more common in lesions on sunexposed areas and is associated with the occurrence of annular pigmentation on dermoscopy of primary lesions.

**KEYWORDS:** recurrent nevus, pseudomelanoma, melanocytic nevus, immunohistochemistry, BRAF

## **7.3 INTRODUCTION**

Recurrent nevi (RN), also known as *pseudomelanoma*, is an important differential diagnosis of melanoma when a pigmented lesion occurs on scars. Therefore, recognition of its clinical and dermoscopic characteristics is of great importance to avoid unnecessary surgical treatments, especially in those cases in which the histopathological diagnosis of the primary lesion is unknown.

They are known to occur in younger patients, most commonly appearing within 6 months after the excision of the original nevus, and tend to stop growing with time, unlike melanoma, which continue to progressively increase and can appear months to years after the primary lesion has been removed (1, 2, 3). Recurrent nevi more commonly appear following shave biopsies, and among the subtypes of common nevi, they usually occur when the initial lesion has a dermal component (compound and intradermal nevi) (1,2,4).

The most relevant dermoscopic findings of recurrent nevi are the presence of segmental radial lines, heterogeneous pigmentation and globules. Notably, the recurrent lesion does not extend beyond the edge of the scar, a very relevant fact in the differentiation from recurrent melanoma, in which the scar borders are not respected (3,5,6,7,8). Moreover, annular pigmentation, multiple colors, terminal hair and dots have been described recently as dermoscopic predictors of recurrence when these features are present in primary lesions (2).

Despite the characteristics described above, clinical diagnosis is not always possible and equivocal lesions should be removed. Upon histopathologic examination, the classic pattern described is a trizonal pattern, consisting of a lentiginous junctional component on a dermal scar, in addition to the presence of residual deep dermal nevus cells (4). Nevertheless, prominent pagetoid spread, inflammatory infiltrate, architectural asymmetry, melanocytic atypia, and follicular involvement have also been described, demonstrating that histologically these lesions may also represent a diagnostic challenge (1,4,9).

It is suggested that recurrent nevi (RNs) might present similar immunohistochemical expression pattern in comparison to benign melanocytic nevi. However, data on the immunohistochemical characteristics of these lesions are scanty, (9,10) and the technique can be of great importance in differentiating those lesions with atypical histology.

The mutations that activate BRAF (*v-raf murine viral sarcoma oncogene homolog B1*), a protooncogene of the serine threonine kinase family that regulates cell growth, are frequently found in both melanomas and benign melanocytic nevi. BRAF is believed to be an initial event in melanocytic tumor genesis (11,12,13). As far as we know, its presence in RNs has never been studied, and its role in the genesis of these lesions is unknown.

The aim of this study is to characterize histopathologic features of recurrent melanocytic nevi and also its immunohistochemical expression pattern. Additionally, we will investigate the association of BRAF expression in these nevi with clinical and dermoscopic characteristics of their primary lesions.

## 7.4 METHODS

### *Sample*

A cross-sectional study was conducted using 58 recurrent melanocytic nevi obtained from a previous prospective study (2). We performed standardized shave biopsies of 224 common melanocytic nevi from 61 patients who presented to the Department of Dermatology of *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* between September 2013 and January 2014. All lesions included were clearly of benign origin and had only been removed at the request of the patients either due to local symptoms or aesthetic discomfort. Recurrences had been detected at the 6-month follow-up visit, and the recurrent lesions were completely excised for analysis. The project was approved by the Research Ethics Committee of the institution, and all the patients signed an informed consent form.

### *Clinical data collection*

The following clinical data obtained from patients and the precursor lesions were used in the analysis: sex, age, phototype and the anatomical location of the lesion. Location was defined as a sunexposed area if the lesions occurred on the face and extremities, and as sunprotected areas if occurred on trunk. The following dermoscopic data on the precursor nevi were also analyzed: global pattern, dots, globules, structureless areas, number of colors, the presence of vessels, the presence of terminal hair, and annular hyperpigmentation

### *Histologic analyses*

The slides were analyzed by an experienced dermatopathologist, and the following histological findings were assessed: architectural symmetry, presence of trizonal pattern, presence of residual nevus, lentiginous hyperplasia, pagetoid spread, confluent melanocytic nests, nevus cells “dropping off” into the scar, presence of melanophages, fibrosis, inflammation, adnexal nevus involvement, perineural nevi involvement, mitosis, and nuclear atypia.

### *Immunohistochemical analyses*

The immunohistochemical reaction was performed on the Benchmark ULTRA® automation platform (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona) and the paraffin block samples were cut on a microtome set to 3µm. Additionally, each slide received a positive control and dewaxing was performed on the equipment using the EZ PREP reagent. Antigenic recovery was performed using ultra CC1, pH 9.0, at 95°C for 64 minutes, followed by peroxidase blocking with the Ultra View Universal DAB Inhibitor reagent (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), present in the detection system. The following primary antibodies were used: anti HMB-45, clone HMB45, dilution 1:100 (Cell Marque®) which was incubated for 32 minutes at 42°C; anti-Ki67, clone 30-9(Roche®), incubated for 16 minutes at 37°C; anti-Tyrosinase, clone T311, (Cell Marque®), incubated for 12 minutes at 37°C. After incubation of the primary antibody, the reaction was detected with the aid of the Ultra View Universal DAB detection kit (multimers), using the diaminobenzidine chromogen (DAB) present in the kit. The slides were counterstained with Mayer's hematoxylin, differentiated with Bluing reagent (Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), and examined after dehydration and mounting. In processing the slides for the BRAF antibody, antigenic recovery was performed at 100°C, and the antibody used was the anti-BRAF, clone VE1(Roche®), which was incubated for 20 minutes at 36°C. The antibody reaction was detected with the aid of the Optiview DAB IHC detection system (multimers + linker), using the chromogen diaminobenzidine (DAB) present in the kit, with the remaining steps being the same as those described for the other markers.

IHQ expression was assessed initially by the positivity of the antibodies. Additionally, we analyzed the expression pattern throughout the components of the nevi and divided in homogeneous, when the expression happened in all nevi portions with the same intensity, or heterogeneous, describing the intensity of the staining on junctional and dermal components of the lesion. In the evaluation of KI-67, the percentage of nevus cells with antibody expression was estimated.

We also investigated the association of BRAF immunohistochemical expression and the presence of clinical and dermoscopic predictors of recurrency described above.

### *Statistical analyses*

The data are presented with their frequencies. The association of variables was measured using Fisher's exact test, with a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ), with the Student's *t* test being used for quantitative variables.

## 7.5 RESULTS

The histopathological findings are detailed in Table 1.

The vast majority of the evaluated lesions (49/58, 84.5%) had the classic trizonal pattern, characterized by the presence of a lentiginous junctional component, associated with a fibrous dermal scar on nests of residual deep nevus cells (Figure 1). In 8 lesions (13.8%), no deep residual nevus component was seen, while being present in the others.

Most of the recurrent nevi (33/58, 56.9%) showed: architectural asymmetry (characterized by differences in the contours, size and shape of the nests of melanocytic cells, the distribution of the intraepithelial and dermal components, and inflammatory infiltrate in relation to the two halves when the lesion was divided through the center by an imaginary vertical axis); in addition to mild to moderate lentiginous hyperplasia (44/58, 75.9%), while being prominent in only 4 lesions.

Fibrosis (57/58, 98.4%) and inflammation (56/58, 96.5%) were found in virtually all the lesions. Most of the lymphocytic inflammatory infiltrate was graded as mild, located perivascularly in the superficial dermis in 65.5% of the cases and, in addition to perivascular, also associated with the scar region in 29.3% of them.

We noted the presence of confluent of junctional nests in a few lesions (7/58, 12.1%), as well as the nevus cells “dropping off” into the scar (1/58, 1.7%). No perineural involvement was seen, nor were mitoses found in the entire sample.

While the presence of melanophages was a common finding (46/58, 79.2%), adnexal involvement (13/58, 22.3%) was less frequent, occurring prominently in only 2 lesions.

Approximately 30% of RNs showed pagetoid spread, which in all cases was graded as mild or moderate. Cellular atypia was found in 15% of the sample, with no cases of marked atypia.

In relation to immunohistochemical antibodies, the HMB-45 marker was positive in 57 of the 58 RNs (98.3%). The expression showed a gradient pattern, being strongly positive in the junctional component, tending to be negative in the deeper portions of the nevi (Figure 2). Tyrosinase presented the same gradient pattern as HMB-45, being positive in 91.4% of cases (53/58).

The KI-67 expression showed a staining index that varied from 1 to 8% of the junctional nevus cells, with an average of 2.83%. The staining was positive in the dermal nests of only one lesion. All the others were only positive in the junctional component.

Positive BRAF expression was found in 42 recurrent nevi in our sample (72.4%). The staining was seen to occur exclusively in the junctional portion in 7 lesions, in the dermal portion in 28 and in both locations in 7 lesions (Figure 3).

We analyzed BRAF expression positivity and the clinical features of the primary lesions (Table 2), and we found an association with its location in a photo-exposed area ( $p = 0.01$ ) and with the dermoscopic presence of annular hyperpigmentation ( $p = 0.041$ ).

## 7.6 DISCUSSION

In this study we were able to demonstrate that recurrent nevi mostly present architectural asymmetry and a trizonal histological pattern. These lesions exhibit a low mitotic index when their nuclear expression is evaluated with KI-67, in addition to a gradient pattern of HMB-45 and tyrosinase expression. In addition, we found that BRAF expression is common in these lesions, being present in 72.4% of cases. Moreover, its positivity seems to be more common in nevi on sunexposed areas and to be associated to dermoscopic aspects such as annular pigmentation.

Few studies have objectively attempted to assess the histological characteristics of recurrent nevi (1, 4, 9). Park *et al*, retrospectively analyzed a sample of such lesions and reported that most displayed a trizonal histological pattern. In our study, this pattern, found in 84.5% of the RNs, was more prominent than in the sample described, which reported it in 52% of the 175 assessed lesions. The difference is probably related to the diversity of surgical methods used by them, which were not detailed (4).

In their sample of 15 RNs, Hoang *et al*, described the presence of architectural asymmetry, which is rare in primary melanocytic nevi, in about half the lesions (9). We found a very similar proportion of architectural asymmetry in our sample of lesions.

The fact we found no mitoses also corroborates data previously described in the literature, and serves as an important differentiating factor with melanocytic lesions of

malignant origin, in which the mitotic index is usually high. When mitoses are found in RNs, they occur in the junctional component of the lesion (4, 9).

The presence of nevus cells in a perifollicular arrangement or invading adnexal structures has been described, but this finding was not more prominently found than in primary nevi in the previous series, being described in about 6% of cases (1, 9). It was more common in our sample (22%), however due to the relatively small sample size, it may be due to inter-observer variance, and cannot be considered relevant data.

Moderate melanocytic atypia has been found in RNs, with reports of larger nevi cells, more prominent nuclei and nucleoli, being described as significant when compared to the primary nevi. Intense atypia, as found in melanomas, has not been described (1, 4, 14). Our data on the prevalence and intensity of this finding are similar to the previously published data.

Pagetoid spread, a finding that may hinder differentiation from melanoma, tended to be discreet in most lesions, as was inflammatory infiltrate. This was found in almost the entire sample, and also as previously described, it is not very prominent and is located predominantly in the upper dermis in a perivascular position (4, 9).

The presence of nevus cells "dropping off" into the dermal scar was not a significant finding in our series, being found in only 1 lesion, in contrast to what was reported by Park *et al*/who found it in one third of their sample (4). On the other hand, the presence of melanophages was a common finding in our RNs.

Anatomopathological examination of all the characteristics described above can easily differentiate the vast majority of recurrent nevi and melanomas. Nevertheless, a minority of lesions may demonstrate a combination of common findings such as pagetoid spread, the irregular distribution of melanocytic nests, adnexal involvement, cytological atypia and more prominent lymphocytic infiltrate, which may lead to diagnostic doubt mainly in relation to regressed melanoma and recurrent melanoma, thus requiring application of the immunohistochemistry technique (15).

Characterization of the immunohistochemical profile of RNs has been little explored in previous papers. The same study by Hoang *et al*, which analyzed 15 lesions in terms of the histopathological pattern, reported their sample was 100% positive for S-100 and Melan-A/MART-1, a finding that does not differentiate between benign and malignant melanocytic lesions, as these markers serve to differentiate melanocytic lines from other cell lines (9, 16, 17).

We showed expressive positivity of HMB45 and tyrosinase, with the staining



pattern, with strong junctional positivity and decreased presence in the dermal component, characteristic of benign lesions. This finding had been characterized in Hoang's sample (9). The HMB-45 marker (human melanoma black 45) is a monoclonal antibody directed against a glycoprotein component of the premelanosome (gp100), which identifies active, immature and intradermal melanocytes and is not a marker for quiescent melanocytes (16, 17). Tyrosinase is an enzyme involved in melanin biosynthesis, and is a highly sensitive and specific cytoplasmic marker for melanocytic lesions (18, 19).

As for the KI-67 marker, used to identify cell proliferation, our data go against those reported by King *et al*, whose marking displayed a proliferation index of equal intensity in the dermal and junctional nevus portions, and again resemble the Hoang's sample, which shows predominantly junctional positivity, with a low proliferative index. We showed an average junctional marking of 2.83%, a much lower figure than expected for malignant melanocytic lesions, which usually present a positive index in about 10 to 30% of the cells, over the entire extension of the lesion (9, 18, 20, 21).

For the minority of recurrent nevi that cannot be differentiated by means of clinical, dermoscopic or histopathological examination, we suggest a panel combining HMB-45 or tyrosinase plus KI-67 would be sufficient to differentiate between recurrent nevi and melanomas (primary or recurring), without the need for additional markers.

As yet, the pathophysiological mechanism behind recurrent nevus has not been completely clarified and, despite there being several proposed theories, none has been shown to be definitive (22, 23, 24, 25, 26, 27). We aimed to investigate for the first time a potential role of BRAF in this scenario. We found BRAF expression in 72.4% of our RNs, a figure similar to that described for common acquired nevi (11,12). Yeh *et al* reported among acquired nevi a homogeneous BRAF expression pattern in all the nevus cells of the positive cases and inferred that BRAF mutation might trigger the clonal expansion of the lesions (11). Marchetti *et al* also showed a homogeneous BRAF expression in positive cases across all the nevus cells (28). Surprisingly, we observed a heterogeneous BRAF expression pattern in recurrent nevi. Indeed 35 of the 44 lesions were positive only in one portion of the lesion either the junctional or the dermal nevus component. Interestingly when BRAF expression was positive in both components, it showed a homogeneous pattern across all nevus cells, thus corroborating the previously described data in acquired nevi. This finding suggests the presence of different cell lines in each portion in those nevi and strongly suggest that



the junctional portion of recurrences does not derive from the multiplication of the remaining dermal nevus cells in such cases.

When evaluating BRAF expression with clinical data of primary lesions we could demonstrate that it was associated with lesions located in sunexposed areas. It is not completely elucidated the potential role of sun exposure in BRAF positive cells in melanocytic tumors. Viro *et al* showed in an elegant assay that UV might accelerate BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. (29) Moreover, Thomas *et al* also demonstrated in melanoma cells, that early in life UV exposure was more associated with BRAF mutated melanomas (30). Contrastingly other studies do not show effects of UV exposure in BRAF expression (31, 32). Ichii-Nakato *et al*, described high rates of BRAF mutation, assessed via DNA sequencing analysis, both in nevi located in chronic sundamaged areas as well as in sunprotected areas, suggesting that UV exposure would not be a determining factor for the acquisition of the mutation, but perhaps being relevant in other stages of the tumor process (32). Karram *et al*. assessed the prevalence of mutation in the nevus cells in relation to geographic areas with different solar incidences, different anatomical locations of the nevi and cumulative chronic cutaneous solar damage measured by the degree of solar elastosis, and found no data to support any relevant role of UVR exposure as a promoting factor (31). It is beyond the scope of this study to elucidate the pathway for this association, but it seems that BRAF positive expression in recurrent nevi occur more frequently in sunexposed areas. We could not find statistical association of BRAF expression with other clinical data such as age, phototype, and presence of tanning.

We also found an association of BRAF positive expression with annular hyperpigmentation. We initially described this dermoscopic finding as a relevant predictor of nevus recurrency (2). We speculate that it could mean greater nevus activity in the perifollicular region, which is crucial for repopulation of the dermoepidermal junction by totipotent cells. Further studies are needed to confirm this hypothesis. Other dermoscopic aspects of the primary lesions we not associated with positive BRAF expression.

Our study has some limitations. Some analyses would benefit of a larger sample, more immunohistochemical antibodies could have been tested and histopathological examination could be checked by a second dermatopathologist. Nevertheless, we are confident that our results reflect the histologic and immunohistochemical scenario of recurrent nevi.

In summary, we demonstrate that the typical histopathology of recurrent nevi displays a trizonal pattern associated with architectural asymmetry, while common histological findings include the presence of lentiginous hyperplasia, fibrosis, inflammation, and the absence of mitosis and cell atypia. We have demonstrated that these lesions exhibit a low proliferative index through the nuclear expression of KI-67, in addition to the graded expression of the HMB-45 and tyrosinase markers. Furthermore, we demonstrated for the first time the BRAF immunohistochemical expression in these nevi and demonstrated that it occurs independently in the junctional and dermal portions. Finally, we observed that BRAF expression is more frequent in lesions located on sunexposed areas and that it is associated with the dermoscopic finding of annular pigmentation in the primary nevi lesion.

## 7.7 REFERENCES

1- King R, Hayzen BA, Page RN, Googe PB, Zeagler D, Mihm MC Jr. Recurrent nevus phenomenon: a clinicopathologic study of 357 cases and histologic comparison with melanoma with regression. *Mod Pathol*. 2009; 22(5): 611–617.

2- Heck R, Ferrari T, Cartell A, Bakos RM. Clinical and dermoscopic (in vivo and ex vivo) predictors of recurrent nevi. *Eur J Dermatol*. 2019; 29(2): 179–184.

3- Kelly JW, Shen S, Pan Y, Dowling J, McLean CA. Postexcisional melanocytic regrowth extending beyond the initial scar: a novel clinical sign of melanoma. *Br J Dermatol*. 2014;170(4):961–964.

4- Park HK, Leonard DD, Arrington JH, Lund HB. Recurrent melanocytic nevi: Clinical and histologic review of 175 cases. *J Am Acad Dermatol*. 1987;17(2):285-92.

5- Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part II). *Actas Dermosifiliogr*. 2013;104(3):181–203.

6- Compton LA, Murphy GF, Lian CG. Diagnostic Immunohistochemistry in Cutaneous Neoplasia: An Update. *Dermatopathology*. 2015;2(1):15–42.

7- Hoang MP, Mahalingam M, Selim MA. Immunohistochemistry in the diagnosis of cutaneous neoplasms. *Future Oncol*. 2010;6(1):93–109.

- 8- Folpe AL, Cooper K. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: pleomorphic cutaneous spindle cell tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131(10):1517–1524.
- 9- Hoang MP, Prieto VG, Burchette JL, Shea CR. Recurrent melanocytic nevus: a histologic and immunohistochemical evaluation. *J Cutan Pathol.* 2001;28(8):400–406.
- 10- King R, Ziegler D, Page RN, Mihm MC Jr, Googe PB. Persistent melanocytic nevus phenomenon: a clinicopathologic study of 328 patients. *J Cutan Pathol* 2005; 32: 98.
- 11- Yeh I, Deimling A, Bastian BC. Clonal BRAF Mutations in Melanocytic Nevi and Initiating Role of BRAF in Melanocytic Neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105:917–919.
- 12- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003;33(1):19–20.
- 13- Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol.* 2011;164(4):776–784.
- 14- Vilain RE, McCarthy SW, Scolyer RA. The regenerating naevus. *Pathology.* 2016;48(2):108–112.
- 15- Bsirini C, Smoller BR. Histologic mimics of malignant melanoma. *Singapore Med J.* 2018;59(11):602–607.
- 16- Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part I). *Actas Dermosifiliogr.* 2013 Mar;104(2):99-127.
- 17- Prieto VG, Shea CR. Use of immunohistochemistry in melanocytic lesions. *J Cutan Pathol.* 2008;35(2):1–10.
- 18- Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part II). *Actas Dermosifiliogr.* 2013;104(3):181–203.
- 19- Hofbauer GF, Kamarashev J, Geertsen R, Böni R, Dummer R. Tyrosinase immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *J Cutan Pathol.* 1998;25(4):204–209.
- 20- Chatterjee D, Bhattacharjee R. Immunohistochemistry in Dermatopathology and its Relevance in Clinical Practice. *Indian Dermatol Online J.* 2018;9(4):234–244.

- 21- Rudolph P, Schubert C, Schubert B, Parwaresch R. Proliferation marker Ki-S5 as a diagnostic tool in melanocytic lesions. *J Am Acad Dermatol.* 1997;37(2):169–178.
- 22 - Fox JC, Reed JA, Shea CR. The recurrent nevus phenomenon: a history of challenge, controversy, and discovery. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(7):842–846.
- 23- Schoenfeld RJ, Pinkus H. The recurrence of nevi after incomplete removal. *AMA Arch Derm.* 1958;78(1):30–35.
- 24- Arrese Estrada J, Piérard-Franchimont C, Piérard GE. Histogenesis of recurrent nevus. *Am J Dermatopathol.* 1990;12(4):370–372.
- 25- Gougerot H. Recidive des naevi, apres destruction, dans le meme type, dans la meme forme, dans la meme etendue. *Monde Med.* 1947;57(12):50.
- 26- Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature.* 2002;416(6883):854–860.
- 27- Cox AJ, Walton RG. The induction of junctional changes in pigmented nevi. *Arch Pathol.* 1965;79:428–434.
- 28- Marchetti MA, Kiuru MH, Busam KJ, Marghoob AA, Scope A, Dusza SW, et al. Melanocytic naevi with globular and reticular dermoscopic patterns display distinct BRAF V600E expression profiles and histopathological patterns. *Br J Dermatol.* 2014 Nov;171(5):1060–5.
- 29- Viros A, Sanchez-Laorden B, Pedersen M, Furney SJ, Rae J, Hogan K, et al. Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature.* 2014;511(7510):478–482.
- 30- Thomas NE, Edmiston SN, Alexander A, Millikan RC, Groben PA, Hao H, et al. Number of nevi and early-life ambient UV exposure are associated with BRAF-mutant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(5):991–997.
- 31- Karram S, Novy M, Saroufim M, Loya A, Taraif S, Houreih MA, et al. Predictors of BRAF mutation in melanocytic nevi: analysis across regions with different UV radiation exposure. *Am J Dermatopathol.* 2013;35(4):412–418.
- 32- Ichii-Nakato N, Takata M, Takayanagi S, Takashima S, Lin J, Murata H, et al. High frequency of BRAFV600E mutation in acquired nevi and small congenital nevi, but low frequency of mutation in medium-sized congenital nevi. *J Invest Dermatol.* 2006;126(9):2111–2118.

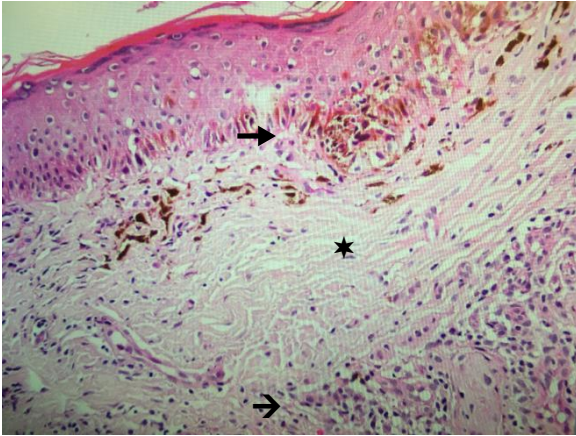


Figure 1- HE (200x) trizonal pattern: lentiginous junctional component (→), associated with a dermal fibrous scar (★) above nests of residual deep nevus cells (→).

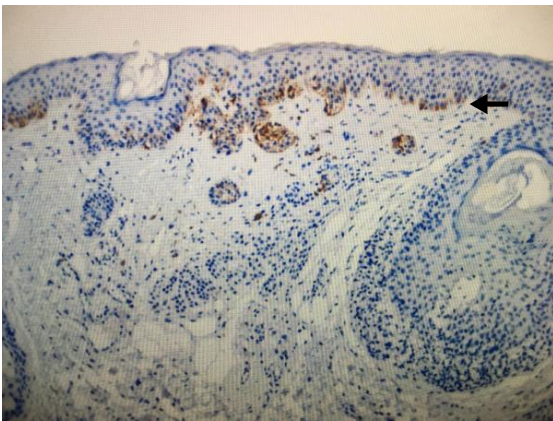


Figure 2 – HMB-45 (100x) gradient pattern: strong expression in the junctional component (→), fading expression towards deeper nevi zones

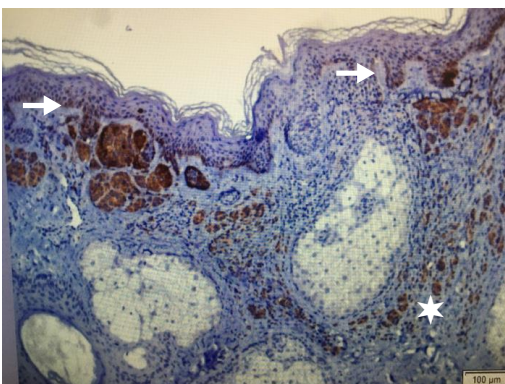


Figure 3 – BRAF (100X) expression in the junctional (→) and dermal component (★).

Table 1: Histological characteristics of the recurrent nevi

<b>Histological features</b>	<b>Number of lesions (%)</b>
Architectural asymmetry	33/58 (56,9%)
Trizonal Pattern	49/58 (84,5%)
Residual nevus cells	50/58 (86,2%)
Lentiginous hyperplasia	44/58 (75,9%)
Pagetoid spread	17/58 (29,3%)
Confluent pattern	7/58 (12%)
Dropping off of nevus cells	1/58 (1,7%)
Melanophages	46/58 (79,2%)
Fibrosis	57/58 (98,3%)
Inflammation	56/58 (96,6%)
Adnexal involvement	13/58 (22,3%)
Perineural involvement	0/58 (0%)
Mitoses	0/58 (0%)
Cellular atypia	9/58 (15,5%)

Table 2: Immunohistochemical characteristics of recurrent nevi

<b>immunohistochemical antibody</b>	<b>Number of lesions with positive expression (%)</b>
HMB 45	57/58 (98,3%)
Tirosinase	53/58 (91,4%)
KI-67	57/58 (98,3%) *
BRAF V600E	42/58 (72,4%)

\* average of 2.83% of junctional cells positivity



Table 3: Frequency of qualitative clinical and dermoscopic features of primary melanocytic lesions and correlation with BRAF mutation

Clinical and dermoscopic features	BRAF positive n (%)	BRAF negative n(%)	P value
Sex			
Female	32 (78%)	16 (94%)	0,253
Male	9 (22%)	1 (6%)	
Skin type			
I	0	0	0,126
II	0	2 (12%)	
III	28 (68%)	11 (65%)	
IV	9 (22%)	4 (23%)	
V	4 (10%)	0	
Anatomical location			
sunexposed area	32 (78%)	5 (29,4%)	<b>0,001</b>
sunprotected area	9 (22%)	12 (70,6%)	
Global dermoscopic pattern			
Reticular	1 (3%)	0	0,707
Globular	3 (7%)	0	
Cobblestone	2 (5%)	0	
Homogeneous	35 (85%)	17 (100%)	
Presence of dots			
Yes	11	3 (17,6%)	0,523
No	(26,8%) 30 (73,2%)	14 (82,4%)	
Presence of globules			
Yes	11	5 (29,4%)	0,893
No	(26,9%) 30 (73,2%)	12 (70,6%)	
Vascular structures			
Yes	22	8 (47,1%)	0,775
No	(53,7%) 19 (46,3%)	9 (52,9%)	
Terminal hair			
Yes	27	10 (58,8%)	0,765
No	(65,9%) 14 (34,1%)	7 (41,2%)	
Number of colours			
1	29	13 (76,5%)	0,290
2	(70,7%)	3 (17,6%)	
3	12 (29,3%)	1 (5,9%)	
Structureless areas			
Yes	-	13 (76,5%)	0,753

No	28 (68,3%)	4 (23,5%)	
	13 (31,7%)		
<hr/>			
Annular pigmentation			
Yes	23 (56,1%)	4 (23,5%)	<b>0,041</b>
No	18 (43,9%)	13 (76,5%)	

*Fisher's Exact Test.*



## 8. Considerações finais

As características histopatológicas e imuno-histoquímicas dos nevos recorrentes ainda foram pouco exploradas na literatura. A diferenciação destes nevos com o melanoma é fundamental, especialmente, quando características do tumor primário estão ausentes e quando as características clínicas e dermatoscópicas das lesões são insuficientes para seu diagnóstico. Neste estudo descrevemos uma análise detalhada de uma amostra destas lesões.

Nossos achados corroboram dados já existentes e fortalecem a caracterização dos nevos recorrentes. O conjunto das características anatomopatológicas descritas no estudo, diferenciam a grande maioria dos NRs e melanomas.

A minoria destas lesões pode demonstrar uma combinação de achados histológicos que pode gerar dúvidas diagnósticas, principalmente com o melanoma com regressão e o melanoma recorrente, necessitando do uso da técnica de imuno-histoquímica.

Para estas lesões, sugerimos que o uso de um painel com HMB45 OU tirosinase + KI-67, seja suficiente para diferenciação entre nevos recorrentes e melanoma, sem necessidade de marcadores adicionais.

Por último, avaliamos de forma inédita a expressão imuno-histoquímica de BRAF nos nevos recorrentes. Sua expressão distinta nas diferentes porções névicas recorrentes, positividade associada a exposição solar e positividade relacionada a pigmentação anular dermatoscópica, agrega conhecimento no campo ainda pouco entendido da gênese das lesões recorrentes. Estes dados agregam conhecimento para realização de novos estudos na área.

## 9. Perspectivas futuras

Este estudo oferece perspectivas para novas análises uma vez que o banco de dados coletado permite vislumbrar projetos que avaliem as expressões imunohistoquímicas avaliadas aqui, em especial de BRAF, também nos nevos precursores e, desta forma, poder auxiliar no melhor entendimento desta via molecular no processo de recorrência.

## 10. Anexos

### Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

##### Introdução:

Este documento visa informar você a respeito do projeto de pesquisa intitulado: “Avaliação das características clínicas, dermatoscópicas e histológicas de nevos melanocíticos recorrentes” expondo suas principais características. Após as explicações verbais e as que se seguem, e a resposta a todas as dúvidas manifestadas, caso você manifeste interesse em aceitar participar do estudo, deverá assinar o seu consentimento. Este termo é elaborado em duas vias, uma ficará com você e outra com o pesquisador.

##### Características Principais:

Sinais de pele, também chamadas de “pintas” ou “belezas” (nevos melanocíticos benignos) são removidos com muita frequência por questões estéticas ou de desconforto. Por vezes, independente da técnica utilizada, resquícios ou pedacinhos do sinal podem permanecer após a sua retirada inicial. O surgimento de uma nova manchinha próxima da cicatriz meses após a retirada, justamente por esta permanência de parte do sinal, pode causar muita dificuldade em se diferenciar de uma lesão cancerosa caso não tenha sido realizada análise por biópsia da primeira lesão. Você está sendo convidado a participar deste estudo por que durante sua consulta de rotina no Serviço de Dermatologia do HCPA manifestou vontade de remover a pinta por motivos estéticos ou desconforto. Esta pesquisa visa analisar as características dos sinais de pele (nevos melanocíticos benignos) por meio de um aparelho que permite observar as mesmas com maior aumento e com uma luz especial (dermatoscopia) de modo a prever quais as mais propensas a voltarem após a sua retirada (nevos recorrentes). Os pacientes voluntários para este estudo devem concordar com todos os procedimentos que serão realizados, abaixo relacionados:

- Exame clínico das lesões de pele (avaliação por médico especialista)
- Fotografias e análise por aparelho específico com lente de aumento e luz das lesões antes da sua retirada (dermatoscopia digital) com a aplicação de álcool-gel na pele. Este exame não causa qualquer dano ao paciente e nem acarreta nenhum tipo de dor ou outros sintomas durante a sua realização. Alguns pacientes relatam apenas sensação de frescor pelo uso do gel em temperatura ambiente.
- Realização de procedimento para retirada da lesão, com anestesia local e corte da parte elevada do sinal, rente à pele, com posterior procedimentos para parar o sangramento (que pode ser por aplicação de uma solução líquida coagulante, compressão da ferida ou cauterização dos vasos sangrantes com aparelho elétrico). Após o procedimento haverá a formação de uma “casca” no local que cairá espontaneamente após alguns dias.
- Reavaliação do local de retirada da lesão em 6 meses, com possibilidade de ser necessário realizar novo exame com o mesmo aparelho se a mesma tiver voltado.
- No total, você precisa comparecer para 2 visitas ao hospital. Na primeira visita após o convite, assinatura deste termo, breve questionário e será realizado o exame do sinal (que deve durar cerca de 15 minutos). A retirada da lesão também será realizada nesta consulta (com tempo máximo de cerca de 20 minutos). No segundo encontro será avaliada a cicatriz e, se o sinal tiver voltado, será realizado o mesmo exame feito na consulta anterior. Os custos para deslocamento até o hospital são de responsabilidade do paciente.

##### Riscos e benefícios:

- Durante a realização da remoção do sinal você poderá experimentar leve desconforto ou dor no local da injeção do anestésico. Este tipo de cirurgia leva a mínimos sangramentos locais, com resolução rápida. Se você não tem histórico de alergia ao anestésico utilizado (lidocaína) corre um risco muito pequeno de apresentar “reação alérgica” ao anestésico. Da mesma forma o risco de infecção local é muito pequeno.
- Você não terá nenhum benefício direto com a participação nesta pesquisa. Apenas estará contribuindo para a aquisição de novos conhecimentos importantes para pacientes futuros na área da dermatologia.

Informações Adicionais:

- Caso não queira participar do estudo, sua lesão de pele será tratada normalmente no ambulatório, conforme avaliação do seu médico assistente e rotina ambulatorial do serviço de dermatologia do HCPA.
- Você poderá desistir de participar do estudo a qualquer momento sem prejuízo no seu atendimento.
- As informações obtidas no estudo são confidenciais no sentido de preservar a identidade dos pacientes. Seu nome não será revelado.
- Ao final do tratamento os pacientes em que a lesão tiver voltado, serão reavaliados em seu ambulatório de origem quanto à necessidade e risco/benefício de outro procedimento local; se este for indicado, será realizado de acordo com a rotina ambulatorial do serviço de dermatologia. Importante comentar que o retorno de uma mancha originada da retirada de um sinal benigno não acarreta nenhum prejuízo a sua saúde.
- Os pesquisadores ficam à disposição para eventuais esclarecimentos sobre quaisquer aspectos da pesquisa.

Pesquisador responsável: Prof Renato Bakos

Pesquisadora: Dra. Renata Heck

FONE: 33598571

Local: Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Comissão de Ética e Pesquisa do HCPA: 33597640

CONSENTIMENTO: Eu, \_\_\_\_\_, estou ciente dos termos deste documento e aceito, sem restrições, participar da pesquisa em questão.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente

Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador

## Anexo 2 – Ficha de avaliação histopatológica/imuno-histoquímica

**HE** Simetria X  Assimetria arquiteturalPadrão trizonal:  não  simHiperplasia lentiginosa:  não  simDisseminação pagetoide:  não  simPadrão confluyente:  não  sim“Dropping off” na cicatriz:  não  simMelanófagos:  não  simFibrose:  não  simInflamação:  não  sim juncional  cicatriz  perivascularEnvolvimento anexial:  não  simEnvolvimento perineural:  não  simNevo residual:  não  simMitoses:  não  sim juncionais  dérmicasAtipia nuclear:  não  sim**KI67**  +  -

% cél positivas

\_\_\_\_ juncionais

\_\_\_\_ dérmicas

**HMB45**  +  - juncional/gradiente homogêneo**Tirosinase**  +  - juncional/gradiente homogêneo**BRAF V600E**  +  - nevo residual dérmico juncional

### Anexo 3 - STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of *cross-sectional studies*

	Item No	Recommendation
<b>Title and abstract</b>	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract <b>Pág. 47</b> (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found <b>Págs. 47 e 48</b>
<b>Introduction</b>		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported <b>Págs. 48 e 49</b>
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses <b>Pág. 49</b>
<b>Methods</b>		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper <b>Pág. 49</b>
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection <b>Págs. 49, 50 e 51</b>
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants <b>Pág. 49</b>
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable <b>Págs. 49, 50 e 51</b>
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group <b>Págs. 49, 50 e 51</b>
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias <b>Págs. 50 e 51</b>
Study size	10	Explain how the study size was arrived at <b>Págs. 49</b>
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why <b>Págs. 49, 50 e 51</b>
Statistical methods <b>Pág. 51</b>	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions (c) Explain how missing data were addressed (d) If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy (e) Describe any sensitivity analyses
<b>Results</b>		
Participants <b>Pág. 51</b>	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed (b) Give reasons for non-participation at each stage (c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data <b>Págs. 51 e 52</b>	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest
Outcome data <b>P</b> <b>Págs. 51 e 52</b>	15*	Report numbers of outcome events or summary measures
Main results <b>Págs. 51 e 52</b>	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period

Other analyses <b>Págs. 51 e 52</b>	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses
<b>Discussion</b>		
Key results <b>Pág. 52</b>	18	Summarise key results with reference to study objectives
Limitations <b>Pág. 56</b>	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias
Interpretation <b>Págs. 53-56</b>	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence
Generalisability <b>Pág. 56</b>	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results
<b>Other information</b>		
Funding <b>Pág. 56</b>	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based

\*Give information separately for exposed and unexposed groups.