

ESTUDO DE VIA DE PI3K EM MELANOMAS DE CORÓIDE

GWENYTH MAY FREEMAN

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Co-Orientadora: Dra. Maria Dirlei Begnami

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Freeman, Gwennyth May

Estudo de via de PI3K em melanomas de coróide / Gwennyth May Freeman
– São Paulo, 2012.

132p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares.

Descritores: 1. NEOPLASIAS DA CORÓIDE. 2. MELANOMA. 3. NEOPLASIAS UVEAIS. 4. FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASE. 5. IMUNOISTOQUÍMICA. 6. HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE.

DEDICATORIA

Aos meus pais, que (quase) nunca cansaram de responder as minhas perguntas de
“Por que isto é como é.....?”

A Deus, pessoa mais importante na minha vida, que nunca me falhou e nunca me
faltará...

“The most beautiful emotion we can experience is the mysterious. It is the
fundamental emotion that stands at the cradle of all true art and all science. He to
whom this emotion is a stranger, who can no longer pause to wonder and stand rapt
in awe, is as good as dead: a snuffed out candle”..

“Science without religion is lame. Religion without science is blind”.

“I want to know how God created this world. I am not interested in this or that
phenomenon, in the spectrum of this or that element. I want to know God’s thoughts:
the rest are details”.

Albert Einstein.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares pela confiança e pela oportunidade de ser aluna. Agradeço pelas reflexões e pelo apoio.

Agradeço a Dra Maria Dirlei pela colaboração, sempre disponível e aberta para o diálogo e discussão.

Gostaria de mencionar também algumas pessoas que me influenciaram no meu passado:

Agradeço o Prof. Alan Bird, de Moorfields Eye Hospital, que sempre me encorajou” Keep thinking, Gwentyth. The ideas will come.”, e aos oftalmologistas que relataram comigo, especialmente o Mr. Calos Pavésio e o Mr. John Hungerford, e Dr. Graham Holder.

Aos meus professores da área clínica no Canadá, os Drs Araan Rifkind e Henry Witelson, que me encorajaram a buscar novos desafios.

Aos Professores D. Lindsay e R. Freitag que orientaram a minha primeira tese em Entomologia, no Lakehead University e estimularam a percorrer os caminhos da pesquisa.

Aos funcionários de biblioteca na Fundação Antônio Prudente, que me acolheram e ajudaram tanto durante esta tese.

Ao Dr. José Humberto Fregnani e Aline Damascena pela ajuda enorme que eles sempre me deram.

As funcionárias de Pós Graduação pela paciência.

Aos alunos de Pós Graduação da FAP, pelo companheirismo.

E aos vários amigos da Igreja Episcopal Anglicana da Brasil: Thiago Neves, Helder Savir, Alexandra Savir, Cláudio Martinelli, Leno Guides, o Dom Roger Bird e a sua esposa Elizabeth, Gisela Braga, Beth Sanchez, Victor Hugo e Gilberto, Ruth, Jasko e todos os outros membros de coro de São João, Sérgio, Nelson, Mayk e Sheila, Malu, Paulo e Tiemi, Rev César Alves SSF, Geraldo, Marcelo, e a Josy e seu marido André.

RESUMO

Freeman GM. **Estudo de via de PI3K em melanomas de coróide**. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O melanoma de coróide é o tumor ocular primário mais comum em adultos. Apesar de ser pouco frequente, tem incidência estimada em 2-11 casos por milhão de pessoas por ano. Os portadores perdem a visão útil do olho afetado em aproximadamente dois anos depois do tratamento com a irradiação, ou diretamente depois de uma enucleação. Adicionalmente, metade destes pacientes desenvolvem metástases, morrendo dentro de um ano. Não existe um tratamento satisfatório para a doença metastática e a sobrevida desta doença não sofre modificações nos últimos 60 anos ou mais. No Brasil, há poucos estudos epidemiológicos e histopatológicos feitos neste assunto. Na literatura mundial, sabe-se pouco sobre as vias moleculares envolvidas no crescimento, desenvolvimento do tumor primário e das metástases, sendo poucos os trabalhos que se utilizam de métodos imunoistoquímicos (IIQ), e hibridização fluorescente *in-situ* (FISH). Os resultados deste estudo mostraram que os pacientes com MMC no Brasil têm um perfil semelhante aos descritos na literatura em alguns aspectos, principalmente aos da Europa. Este é o primeiro estudo brasileiro que descreve as várias características clínicas e epidemiológicas de um grupo com uma casuística como a nossa. Nem os resultados da IIQ nem o de FISH mostraram uma diferença significativa entre os tumores primários para o desenvolvimento ou não de metástases. Somente o tipo histológico ficou com significância no modelo multivariado.

SUMMARY

Freeman GM. [Study of the PI3K pathway in choroidal melanoma]. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Choroidal melanoma is the most common primary ocular tumor in adults. Although rare, the estimated incidence worldwide lies between 2-11 cases per million population per year. These patients lose useful vision in the affected eye within two years if treated with irradiation, or immediately upon enucleation. Half of these patients will eventually develop metastatic disease, for which the prognosis is very poor, with survival being on average from six to twelve months. Additionally, no satisfactory treatment exists for metastatic disease and the survival estimates have remained unchanged for the last sixty years or more. Here in Brazil, there are very few clinical studies on choroidal melanoma in terms of epidemiology and histology. This study is the first to describe some of the clinical and epidemiologic characteristics of a large group of Brazilian patients. The results of this present study show that patients with choroidal melanoma from Brazil share many of the same clinical characteristics as patients abroad, principally those from Europe, although there are some differences as well. In the world literature, very little has been published on the molecular pathways involved in terms of growth of the primary tumor or the development of metastases, using Immunohistochemistry and Fluorescent in-situ Hybridization methodology (FISH). In this study, neither the immunohistochemistry nor the FISH results showed a significant difference between the primary tumors and the tumors which metastasized. One molecular marker gave results close to statistical significance, but in fact only the predominant histological cell type was statistically significant in the multivariate analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Capacidades adquiridas dos cânceres.....	11
Figura 2	Esquema de redes de sinais possíveis dentro de cada célula tumoral..	12
Figura 3	Alvos terapêuticos contra o câncer.....	14
Figura 4	Esquema mostrando as vias de RAS-MAPK, suas interações com p53 e Rb, e sítios possíveis para inibidores químicos.....	16
Figura 5	Vias de mTOR e MAPK, com moléculas efetores.....	17
Figura 6	Vista em geral das vias de Ras/PI3K/PTEN/mTOR com sítios possíveis para inibidores.....	27
Figura 7	As vias de PI3K/Akt/mTOR, mostrando vários efeitos de ativação de Akt as funções celulares.....	36
Figura 8	O sistema de mTOR.....	39
Figura 9	Curva de ROC para PTEN, utilizando o teste de FISH.....	71
Figura 10	PTEN (FISH) com metástases, comparado ao sem metástases.....	72
Figura 11	Figura de Sobrevida total em meses.....	75
Figura 12	Intensidade de marcação de PTEN.....	78
Figura 13	Intensidade de marcação de PI3K.....	79
Figura 14	Intensidade de marcação de AKT.....	80
Figura 15	Intensidade de marcação de FOS-AKT.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação de critérios.....	47
Tabela 2	Gênero de casuística total.....	63
Tabela 3	Idade de casuística total.....	64
Tabela 4	Comparação de idade versus presença de metástases.....	64
Tabela 5	Raça indicada no prontuário.....	64
Tabela 6	Intervalo de queixas até o diagnóstico de MMC.....	65
Tabela 7	Intervalo de queixas até o diagnóstico em pacientes que desenvolveram metástases e aqueles que não.....	65
Tabela 8	Comparação entre número de pacientes tratados pela enucleação primária ou por braquiterapia.....	65
Tabela 9	Incidência de metástases em pacientes com braquiterapia e enucleação depois, comparado aqueles com enucleação primária.....	66
Tabela 10	Histologia da célula predominante na casuística.....	66
Tabela 11	Volume de tumor (sem e com metástases) comparado ao tipo de célula histológico.....	67
Tabela 12	Dimensões dos tumores em mm.....	67
Tabela 13	Variáveis clínicas, comparando os pacientes com e sem metástases Variáveis vs Metástase.....	68

Tabela 14	Tabela mostrando os resultados positivos e negativos dependente de ano: Positividade de AKT.....	68
Tabela 15	Positividade e negatividade para os marcadores utilizados.....	69
Tabela 16	Comparação de valores de positividade e negatividade de dois fabricantes de marcador para o mTOR.....	69
Tabela 17	Comparação do desenvolvimento de metástases ou não, comparado com a positividade ou a negatividade dos marcadores.....	70
Tabela 18	SCE em cinco (5) anos e RR para o seguimento total.....	73
Tabela 19	SLD em 5 anos e RR (tempo de seguimento total) nas características do TUMOR (dados clínicos).....	74
Tabela 20	Sobrevida CE em 5 anos e RR para o seguimento total para os marcadores.....	74
Tabela 21	Sobrevida LD em 5 anos e RR para o seguimento total para os marcadores.....	75
Tabela 22	Tabela, mostrando as variáveis de histologia que ficam com significância no modelo múltiplo para a sobrevida câncer específico (SCE em cinco anos).....	76
Tabela 23	As variáveis significativas no modelo múltiplo para a sobrevida livre de doença.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Altura
AKT	<i>Protein Kinase B (Oncogene in transforming retrovirus AKT8)</i>
ASK 1	<i>Apoptosis signal –related kinase 1</i>
BAD	<i>pro apoptotic protein of Bcl2 family</i>
BH3	<i>Bcl-2-homology domain 3 (Bcl-2-homology domain 3 only members= Puma, Noxa, Bad, Bim, Bid)</i>
BRAF	<i>Serine/threonine-protein kinase B-Raf, B-Raf; Protooncogene B-Raf; vRaf murine sarcoma viral oncogene homology B1.</i>
CCND1	<i>regulatory component of the cyclin D1-CDK4(DC) complex;</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2 A Sítio com 2 transcritos distintos</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hyridization</i>
CgP	<i>Cytosine and guanine join formed by a phosphodiester bond</i>
Chk1	<i>Chk 1 protein kinase</i>
c-JUN	<i>C-Jun N-termianl kinase (JNKs)</i>
cKIT	<i>Proto-oncogene c-Kit; CD117; mast/stem cell growth factor receptor (SCFR); first described as the cellular homolog of the sarcoma viral oncogene c-Kit.</i>
cMet	<i>Met Tyrosine kinase</i>
COMS	<i>Collaborative Ocular Melanoma Study</i>
CREB	<i>c AMP response element binding protein</i>
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DAPK1	<i>Death-associated protein kinase</i>
DBL	<i>Diâmetro basal Longitudinal</i>
DBT	<i>Diâmetro basal Transversal</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleaic acid</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>

EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
EUA	Estados Unidos
EUROCARE	<i>European Cancer Registries Working Group</i>
GFRTK	<i>Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase</i>
GNAQ	<i>Guanine nucleotide-binding G(q) subunit alpha.</i>
GRB2	<i>Growth factor receptor bound protein 2;Grb2</i>
GSKαβ-fos	<i>Glycogen synthase Kinase (encoded by GSK alpha and beta)</i>
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i>
H&E	<i>Hematoxylin and Eosin</i>
HACC	Hospital A.C. Camargo
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor-Fator de crescimento de hepaticítio</i>
HN	História Natural
IIQ	<i>Immunohistochemistry Imunoistoquímica</i>
IRS 1	<i>Insulin receptor substrate</i>
Ki67	<i>Antigen Ki67; MKI-67</i>
LILACS	Index Medicus Latino Americano
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
MAb	<i>monoclonal antibody (anticorpo monoclonal)</i>
MAPK	<i>Mitogen activated Protein Kinase</i>
MDM2	<i>Murine double minute 2sis</i>
MEK	molecula pequena ativador de ERK
MGMT	<i>0-6-methylguanine_DNA methyltransferase</i>
miRNA	<i>microRNA</i>
MKK-4	<i>Mitogen activated protein kinase 4</i>
mLST8	<i>protein called Target of rapamycin complex subunitLST8 = G protein beta subunit-like (Gbeta L)</i>
mm	milímetros
MMC	Melanoma maligna de coróide
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycinin</i>

mTORC	<i>mammalian Target of Rapamycin Complex</i>
NEDD 4	<i>neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4</i>
NFκB	<i>Nuclear factor Kappa light chain enhancer of activated B cells</i>
NRAS	<i>RAS type N</i>
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i>
OR	<i>Odds Ratio (Razão de probabilidade)</i>
P14	Outro transcrito de CDKN2A isoforma 4; p19ARF; p12;ARF
P16INK4a	chamado também isoforma 1; um transcrito de CNKN2A
p4EBP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor</i>
p53	proteína 53 , gene suppressor tumoral.
PPAF	Punção por agulha fina
paaF	<i>enoyl-CoA-hydratase isomerase (E.Coli)</i>
PARP	<i>Poly(ADP-ribose) Polymerase</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>
PH	<i>Plectrin Homology</i>
Phosphorylated AKT	Proteína Kinase B fosforizado
Pi (π)	Valor proxima a 3,14
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIP2	<i>phosphatidylinositol 4,5 biphosphate</i>
PIP3	<i>phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate.</i>
pmTOR	<i>phosphorylated mTOR</i>
PtdIns	<i>Phosphatidylinistol</i>
PPAR	<i>gamma Peroxisome proliferogen activated protein</i>
PRAS 40	<i>AKT1S1(PRAS 40); AKT1 substrate 1 (proline –rich)</i>
PTEN	<i>Phosphate and Tensin Homolog</i>
RAF	<i>protooncogene serine/threonine protein kinase;</i> <i>protooncogene c-RAF,c-Raf</i>
RalGEF	<i>Ral Guanine exchange factor</i>

RAR-b2	<i>Retinoic acid receptor beta</i>
RAS	<i>Rat Sarcoma; GTPase</i> que funciona, com um oncogene
Ras genes	Família de genes que codificam estas proteínas
RASSF1A	<i>Ras Effector Homolog gene</i>
Rb	Proteína retinoblastoma
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RR	<i>Relative risk</i> Risco relativo
RREB1	<i>Ras responsive element binding protein 1</i>
S6	<i>Ribosomal protein S6 Kinase</i>
S6K1	<i>Ribosomal protein S6Kinase beta-1</i>
SCE	Sobrevida Câncer Específico
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results Program of the National Cancer Institute USA</i>
Ser	Serina
SH 2 Domain	<i>(Src Homology 2) domain within the Src oncoprotein</i>
si RNA	<i>small interfering RNA</i>
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SOS	<i>son of Sevenless</i>
Src	<i>homologous and collagen gene</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth factor Beta</i>
TMA	<i>Tissue Micro Array</i> (Micro arranjo de tecidos)
TSC 1 / 2	<i>Tuberous Sclerosis Complex 1 and 2</i>
UK	<i>United Kingdom</i> (Reino Unido)
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> fator de crescimento endotelial

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Incidência	2
1.2	Fatores de Risco	4
1.3	Sobrevida	5
1.3.1	História Natural sem Tratamento do Estudo COMS	6
1.3.2	Evolução com Tratamento	6
1.3.3	Evolução por Tamanho Inicial	7
1.4	Prognóstico de Sobrevida com Metástases	8
1.5	Marcadores Moleculares	9
1.5.1	Introdução aos Marcadores Moleculares	10
2	OBJETIVOS.....	51
3	MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1	Casuística	52
3.2	Variáveis Clínicas	53
3.3	Construção dos Tissue Microarray (TMA).....	54
3.4	Reação Imunoistoquímica.....	55
3.5	Protocolo de reação de FISH	59
3.6	Análise Estatística	61
4	RESULTADOS	62
4.1	Dados Demográficos, Histológicos e Clínicos	62
4.1.1	Casuística Clínica.....	62
4.1.2	Marcadores.....	67
4.1.3	Sobrevida	72
5	DISCUSSÃO.....	82
5.1	Parte Clínica.....	82

5.1.1	Idade e Genero	82
5.1.2	Idade, Incidência e Metástases.....	85
5.1.3	Raça.....	88
5.1.4	Intervalo entre a queixa e o diagnóstico.....	92
5.1.5	Tipo de tratamento recebido primariamente	93
5.1.6	Histologia.....	95
5.1.7	Tamanho de tumores.....	98
5.1.8	Sobrevida câncer específica e sobrevida livre de doença	99
5.2	Parte Molecular	103
5.2.1	Condição dos blocos	103
5.2.2	Marcadores.....	103
5.3	Curva de ROC e FISH por PTEN	107
5.4	Fatores de relevância possível pela sobrevida dos pacientes.....	108
6	CONCLUSÕES.....	116
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118

1 INTRODUÇÃO

O melanoma maligno de coróide (MMC), embora raro, é o tumor intra-ocular maligno mais comum de adultos. As células melanocíticas originam-se da crista neural e, se localizam principalmente no trato úveal de olho, que se compõem da íris, corpo ciliar e coróide. Estas células podem começar a crescer e se transformar em células malignas. O crescimento celular tem como consequência o aparecimento de elevações. Alguns sintomas podem se manifestar como chispas de luz, moscas volantes, e diminuição de visão. Os tumores não tratados enquanto de pequeno até médio porte, podem estar associados aos descolamentos da retina, glaucoma neovascular, e posteriormente, invasão local da órbita.

O tratamento depende do tamanho do tumor. Para os tumores com tamanho menor do que quatro mm, é comum o tratamento através a destruição por meio de laser de diodo, crioterapia ou remoção local. Para tumores de porte médio, utiliza-se a braquiterapia com uma placa de Iodo¹²⁵, de Ruténio¹⁰⁶, Paládio¹⁰³, ou o tratamento com “Proton Beam” (feixe de prótons). Os tumores maiores, com tamanho superior a 10 mm, são geralmente tratados com enucleação do globo ocular e colocação posterior de prótese. Em poucos lugares do mundo, a ressecção trans-escleral em bloco pode ser uma possibilidade de tratamento (DAMATO 2000).

O maior problema com estes tumores não é o controle local da doença, mas sim o desenvolvimento de metástases, que acontecem por via hematogênica. A maior frequência destas metástases é no fígado (70-90% dos casos), seguidos do pulmão, dos ossos e da pele acoplada com os tecidos subcutâneos. Quando estas metástases acontecem, elas indicam um pior prognóstico de vida (RIETSCHEL et al. 2005).

DIENER-WEST et al. (2005) relatam que de 2320 pacientes que participaram deste estudo, 739 desenvolveram metástases de MMC. Destes, 46% (344 casos) tinham metástases somente no fígado, enquanto 43% (316 casos) desenvolveram metástases no fígado, e em outros lugares. O restante (11%) revelaram metástases de MMC em outros sítios, excluindo o fígado. Em outro estudo publicado por RIETSCHER et al. (2005), o sítio do primeiro tumor metastático foi o fígado em 60.5% dos casos. O pulmão foi o primeiro sítio em 24.4%, seguido pelos ossos (8.4%) e cérebro (4.2%). É importante destacar que 10.9% de todos os pacientes apresentavam-se com a doença metastática em múltiplos sítios. Do grupo inteiro, 42.89% não tinham doença metastática fora do fígado.

1.1 INCIDÊNCIA

Não encontramos na literatura brasileira, e tampouco de países em desenvolvimento, artigos ou dados sobre a epidemiologia de MMC. Por este motivo a nossa introdução será baseada em dados da literatura mundial.

Estima-se que a incidência de MMC equipara-se entre os homens e mulheres. As incidências variam, dependendo da referência e a população estudada. Estima-se em cada um milhão da população Italiana e Espanhola pelo menos 2 casos de MMC, e na Noruega e Dane mais de oito casos (VIRGILI et al. 2007). Na maioria dos pacientes da raça branca, todavia pode haver um viés visto que a origem destes estudos vem de países em que a população é de raça branca.

O estudo de HU et al. (2005), baseado nas informações de “National Cancer Institute Surveillance, Epidemiology and End Results Program” (SEER) dos EUA, relata registros de 1352 pacientes diagnosticados com MMC. Observa-se que a

incidência por raça em um milhão de população foi de 0,31 (negros), 0,38 (asiáticos), 1,67 (hispânicos) e 6,02 (brancos não-hispânicos). Todas estas diferenças foram estatisticamente significantes, sendo portanto menos frequente na população negra e asiática e sem diferença entre elas. Baseado nestes cálculos, o risco relativo de MMC foi de 1,2 para Asiáticos, 5,4 para os pacientes hispânicos e 19,2 para brancos não hispânicos, comparado ao risco para os negros. Os dados de 1974-87, vindo de *Wills Eye Hospital* em Philadelphia USA, mostraram que somente 10 casos do total de 2585 os pacientes eram negros (PHILLPOTTS et al. 1995). Outro estudo baseado no SEER dos EUA mostrou uma incidência estável de 4,9 por milhão em homens e 3,7 em mulheres durante o período de 1973-1993. Neste estudo, 97,8% destes casos (2438) foram classificados como pacientes brancos (SINGH e TOPHAM 2003). Houve 17 pacientes que se classificaram como negro (17 ou 0,05%), 0,2% casos foram registrados como Asiáticos (5 casos). Neste mesmo estudo a idade média de diagnóstico foi descrita como de 60,4 anos para os homens e de 62,5 anos para as mulheres. A taxa de incidência aumentou progressivamente até os anos de 70, quando foram encontrados 24,5 casos por homens, e 17,8 casos por mulheres por milhão de pessoas nos Estados Unidos.

KUO et al. (1982) confirmaram 65 casos de MMC de *Eye, Ear Nose and Throat Hospital of the Shanghai First Medical College, Shangha*, coletados no período de 1956 a 1975. No *Eye, Ear Nose and Throat Hospital of the Shanghai First Medical College, Shanghai* foram registrados 5.182 casos de tumores oculares benignos e malignos, no mesmo período. A maioria dos pacientes diagnosticados tinha de 31 a 60 anos (74%), e 60% de tumores (39 casos) foram diagnosticados em homens.

BISWAS et al. (2002), em estudo realizado na Índia, relataram que somente 0,02% (71 dos pacientes) de um hospital de referência, que cuidou de 345.331 pacientes

com problemas oculares entre 1987-99, tinham melanomas de coróide, com média de idade de $46,1 \pm 13,8$ anos.

Na Arábia Saudita, em estudo retrospectivo de casos do *King Khalid Eye Specialist Hospital* em Riyadh, durante os anos de 1983 a 2005, relatou um total de 60 pacientes portadores de MMC dos quais somente 40 preencheram os critérios de inclusão de, “Collaborative Ocular Melanoma Study” (COMS). A origem destes pacientes era dos países árabes, sendo que 70% eram de Arábia Saudita. A idade média era de 50 anos (24-77), de uma amostra de 24 homens e 16 mulheres. (razão 1,5:1) (ALSUHAIBANI 2009).

1.2 FATORES DE RISCO

Com relação aos fatores de risco, há muito a se esclarecer sobre melanomas da úvea. Observa-se que pacientes com uma pele clara têm um risco aumentado para ter melanoma de coróide, se comparado as pessoas com pele mais escura, (OR =2,3). Os olhos azuis estão associados à OR de 3,0 para o desenvolvimento de melanoma de coróide (GUÉNEL et al. 2001).

Discute-se muito sobre a exposição solar na literatura. HU et al. (2008) mostraram um aumento de incidência com aumento em latitude em pessoas brancas (“non Hispanics”) nos Estados Unidos. Um fator que causa confusão sobre estas interpretações é o efeito da cor da íris e a quantidade de pigmentação dentro do olho, que não recebe tanto sol. De outro lado, um estudo de VIRGILI et al. (2007) examinando a incidência de melanoma de úvea, mostrou uma associação positiva entre a incidência e o aumento em latitude. Este estudo foi feito usando os dados de incidência de 33 registros de estatísticas sobre câncer do EURO CARE. Este grupo

relatou que a incidência de melanoma de úvea corresponde à uma latitude mais alta, semelhante aos achados por o melanoma de pele. Outro estudo da Austrália mostrou uma correlação positiva entre a exposição total estimada de sol (horas) durante as décadas de vida de 10, 20, 30, e 40 anos e o risco de desenvolvimento de um melanoma de coróide ou corpo ciliar. O risco relativo foi de 1,6 para categoria com mais tempo de exposição ao sol, calculado por exposição durante a semana inteira (VAJDIC et al. 2002).

A quantidade de irradiação indireta difusa foi maior nas latitudes mais altas, e isto explica o aumento de incidência de melanomas de coróide em latitudes mais altas (VIRGILI et al. 2008).

Numa meta análise de 2005, SHAH et al. relataram que das 133 relatos sobre fatores de risco para MMC e não houve evidências suficientes para suportar uma relação entre a irradiação por luz ultravioleta e o desenvolvimento de MMC.

1.3 SOBREVIDA

O MMC foi descrito há mais de cem anos atrás por Fuchs e outros, que recomendaram o tratamento com enucleação. Por esta razão, poucos artigos de sobrevida sem tratamento foram publicados na literatura. Houve incerteza sobre a eficácia da enucleação, na época. Em 1978, no *British Journal of Ophthalmology*, foi publicado um artigo controverso que propôs o tratamento por enucleação, tendo com o resultado um aumento da taxa de mortalidade, comparado à história natural da doença (ZIMMERMAN et al. 1978). Um grande estudo do COMS se propõe a investigar esta hipótese.

1.3.1 História Natural sem Tratamento do Estudo COMS Report No.5

Registrou-se um total de 45 pacientes, sendo que 42 tinham tumores classificados como tumores de tamanho médio (3,1 até 8 mm em altura e com um diâmetro entre 5 até ≤ 16 mm). Estes pacientes tinham uma média de seguimento de 5,3 anos (de 4 até 10, 7 anos) e durante este período, 22 /42 (52%) receberam tratamento. No final deste estudo, houve uma taxa de mortalidade de quase 30 % aos cinco anos (IC95% de 18 até 47%) e 16 pacientes faleceram. Sete destes pacientes não se submeteram ao tratamento enquanto outros nove receberam tratamento. Não houve diferença nem clinicamente nem estatisticamente significativa entre estes dois grupos.

Este grupo de pacientes, inicialmente não tratado, foi comparado ao grupo com tumores de médio porte (com 1317 pacientes) que se submeteram à randomização para tratamento. Houve uma diferença significativa na taxa de mortalidade no grupo de História Natural (HN). Três pacientes com melanomas de tamanho grande faleceram em 1; 5,4; e 12,1 anos. Contudo, este grupo de pacientes foi irrelevante para comparar com os 1003 pacientes registrados no estudo para tumores grandes (COMS 1997b).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o COMS grupo tratado (mortalidade global em cinco anos de 18% (IC95% 16-20%) e o grupo de HN (mortalidade global de aproximadamente 30%). O risco relativo de mortalidade em cinco anos foi de 1,54 para o grupo de HN. Sugere-se que o tratamento dos tumores de tamanho médio teria um tempo de sobrevida de câncer mais prolongado.

1.3.2 Evolução com Tratamento

O maior estudo multicêntrico e randomizado, realizado pelo COMS, concluiu que não houve diferença de sobrevida depois de cinco anos de diagnóstico entre homens ou mulheres. Somente dois fatores foram associados à diminuição de sobrevida: a idade

ao diagnóstico e o diâmetro basal maior (largest basal diâmetro) (COMS 1998b). Outro estudo realizado na Europa em 2007 mostrou que os homens tinham uma mortalidade de 10 % mais alta do que as mulheres (VIRGILI et al. 2007).

1.3.3 Evolução clínica por tamanho inicial

O estudo COMS (1997a) mostrou que melanomas não tratados inicialmente, de tamanho considerado pequeno (sendo 1,0-3,0 mm em altura e maior de 5 mm em diâmetro basal e 204 casos), tinham uma mortalidade global em cinco anos de 6,0% (IC95% de 2,7 até 9,3%) com uma mortalidade por melanoma de 1,0% (IC95% de 0% até 2,5%), e uma mortalidade por melanoma em oito anos de 3,7% (IC95% de 0,7% até 6,6%). Um total de 41% (83 pacientes) do grupo pequeno foi tratado durante o período de seguimento (COMS 1997a).

Ao se comparar os dois grupos de estudo, em tumores de tamanho médio, avaliou-se o tratamento com braquiterapia, usando I^{125} versus a enucleação. A mortalidade cumulativa em 12 anos por metástases de melanoma foi de 22%. Neste estudo, as taxas de mortalidade foram maiores no subgrupo de pacientes acima de 60 anos cujos tumores, inicialmente tiveram um diâmetro maior de 18 mm.

A taxa de sobrevida com melanomas de tamanho grande foi investigada pelo COMS (2001). Este estudo mostrou que, para os tumores com uma altura $\geq$ oito mm com um diâmetro basal $\geq$ 16 mm, ou uma altura $\geq$ 10 mm (independente das medidas de diâmetro), a mortalidade por metástases de melanoma em cinco anos foi de 28% (N=1003), enquanto a mortalidade em 10 anos foi de 43%.

Outros estudos envolvendo uma casuística menor já foram publicados, contudo, todos os estudos foram retrospectivos e descritivos. O COMS foi e continua sendo o único estudo prospectivo e randomizado sobre a epidemiologia e tratamento do MMC.

Existem poucos estudos, retrospectivos, não randomizados, mas de muito valor do ponto de vista epidemiológico, na literatura. De 1962 a 1981, KUJALA et al. (2003) realizaram, em um dos principais hospitais da Finlândia, um estudo com mais de 20 anos de seguimento, em 289 pacientes portadores de melanoma de coróide. Observou-se incidências de mortalidade por metástases de 31% aos cinco anos, 45% aos 15 anos, 49% aos 25 anos e 52% aos 25 anos, em olhos enucleados. Neste estudo, todos os casos foram da raça branca e a idade média foi de 57 anos (de 13 até 97 anos). A idade média de morte por metástases de melanoma de coróide foi aos 69. 61% dos pacientes tiveram a doença metastática por melanoma de coróide como causa da morte.

1.4 PROGNÓSTICO DE SOBREVIDA COM METÁSTASES

Nestes grupos de estudo de COMS, o tempo médio para a morte foi inferior a seis meses; 80 % morreram um ano pós-diagnóstico (IC95% 77-83%), e 92% (IC95% 89-94%) aos dois anos. O tamanho inicial do tumor não influenciou o tempo de diagnóstico até a morte ($P=0,46$ Log. Rank test). AUGSBURGER et al. (2007) relataram deficiências na qualidade das publicações relacionadas com a efetividade do tratamento de metástases de MMC. Um estudo de *Memorial Sloan- Kettering Hospital* mostrou uma sobrevida média da 12,5meses. Este estudo relatou que um grupo de pacientes tinha uma sobrevida com metástases de quatro anos, com fatores relacionados à uma sobrevida maior de: sítio primário de metástases no pulmão ou tecidos moles, sexo feminino e diagnóstico abaixo de 60 anos, um intervalo prolongado entre o diagnóstico da doença no olho e a descoberta de metástases, e o tratamento com cirurgia ou terapia intra-hepática (RIETSCHEL et al. 2005).

Um grupo de 602 pacientes tratados por 10 anos tinha uma sobrevida mediana de 15 meses depois do diagnóstico de metástases no fígado. Deste grupo, aqueles pacientes com uma ressecção completa tinham uma sobrevida prolongada de 25 meses (KODJIKIAN et al. 2005).

MARIANI et al. (2009) publicaram um sumário dos resultados obtidos em 16 anos de tratamento cirúrgico de metástases de fígado. Neste estudo de 3873 pacientes com MMC, 798 desenvolveram metástases de fígado, sendo que 255 se submeteram a cirurgia de ressecção. Os pacientes que tinham uma ressecção completa de ponto de vista microscópico (R=0) tinham uma sobrevida quase dobrada (mediana de 27 meses).

Apesar da escassez de artigos sobre a epidemiologia de MMC nos países em desenvolvimento, no Brasil, não há dados disponíveis nem no INCA nem na base de dados LILACS. Por este motivo, antes de começar um trabalho correlacionando informações sobre marcadores moleculares, considerou-se necessário fazer um perfil dos pacientes tratados no Hospital A.C. Camargo.

1.5 MARCADORES MOLECULARES

Nesta tese estudamos alguns marcadores de via de PI3K, uma via importante na iniciação de formação de tumores e metástases devido às altas taxas de mortalidade. Buscou-se identificar um marcador ou grupo de marcadores como fator preditor do desenvolvimento ou não de metástases

A hipótese foi que os pacientes sem metástases poderiam ter uma expressão diferente daqueles pacientes com metástases, sendo que a expressão de marcadores da via PI3K esteve presente nas fases iniciais de desenvolvimento de outros tumores.

SHEN e ABATE-SHEN (2007) relataram que na próstata, a inativação de PTEN em camundongos está associada ao desenvolvimento tumoral.

Por causa de escassez de informações disponíveis na literatura sobre a via de PI3K em melanomas de coróide, decidimos utilizar com um modelo, a situação já descrita na literatura sobre os melanomas cutâneos e esta via. Por isto a discussão que segue está focada nos melanomas cutâneos, e quando foi possível, os dados disponíveis na literatura sobre MMC são mencionados.

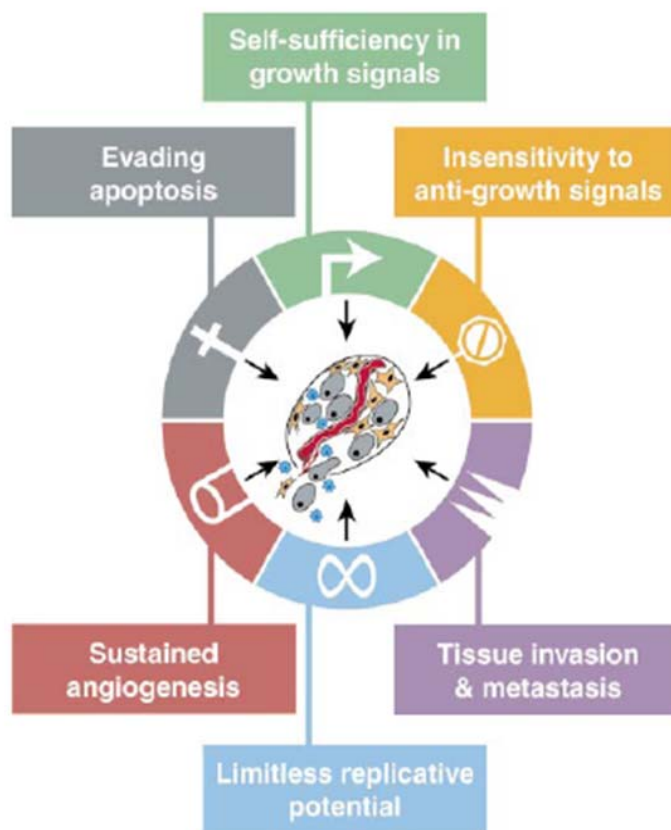
1.5.1 Introdução aos Marcadores Moleculares

Para entender porque um estudo dos marcadores moleculares pode ajudar na investigação sobre as causas de câncer, faz-se necessário relacionar os fatores mais importantes para o desenvolvimento do câncer.

Em 2000, HANAHAN e WEINBERG publicaram um artigo no jornal “Cell”, referência para estabelecer e definir as características do câncer.

Na época, seis características foram descritas:

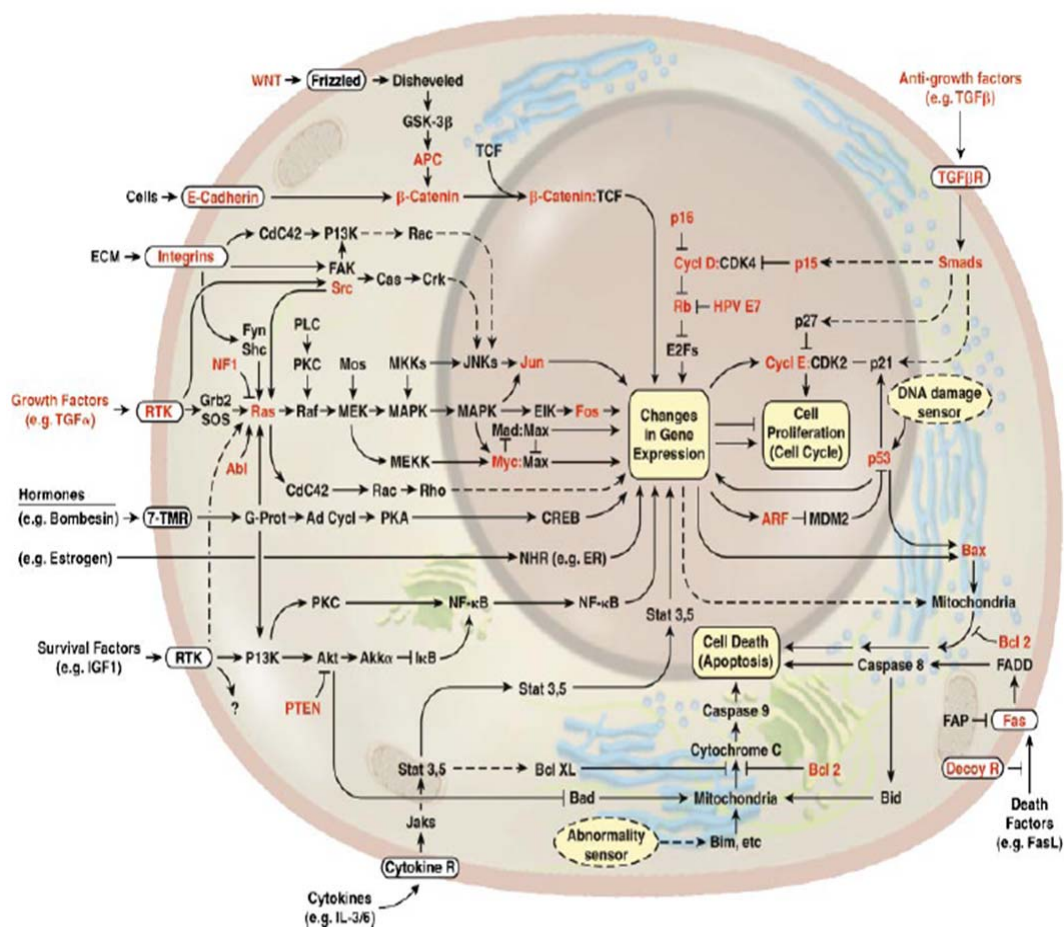
- (1) Manutenção de sinalização proliferativa;
- (2) Fuga da ação de fatores supressores de crescimento;
- (3) Anulação do processo da morte celular, se tornando células imortais;
- (4) Iniciação de angiogênese;
- (5) Ativação do processo de invasão;
- (6) Capacidade de formar metástases.



Fonte: HANAHAN e WEINBERG (2000)

Figura 1 – Capacidades Adquiridas dos Cânceres

No mesmo artigo os autores também mostraram uma figura de várias vias celulares envolvidas no câncer. Neste esquema, a via de PI3K está situada no meio, afetando a expressão de gene no crescimento e sobrevida das células.



Fonte: HANAHAN e WEINBERG (2000)

Figura 2 – Esquema de redes de sinais possíveis dentro de cada célula tumoral

Este esquema de redes na célula mostra que há muitas interações moleculares que acontecem simultaneamente. Todas se envolvem na transmissão de sinais e ativação de enzimas para que a célula possa se modificar e ficar com uma célula imortal, ou seja, uma célula tumoral.

Em março de 2011, HANAHAN e WEINBURG publicaram um artigo revisor, propondo a inclusão de duas características chamadas fatores habilitantes e duas que eles designaram como características emergentes. Os fatores habilitantes são:

- (1) A inflamação produzindo tumores;
- (2) Um genoma instável com mutações.

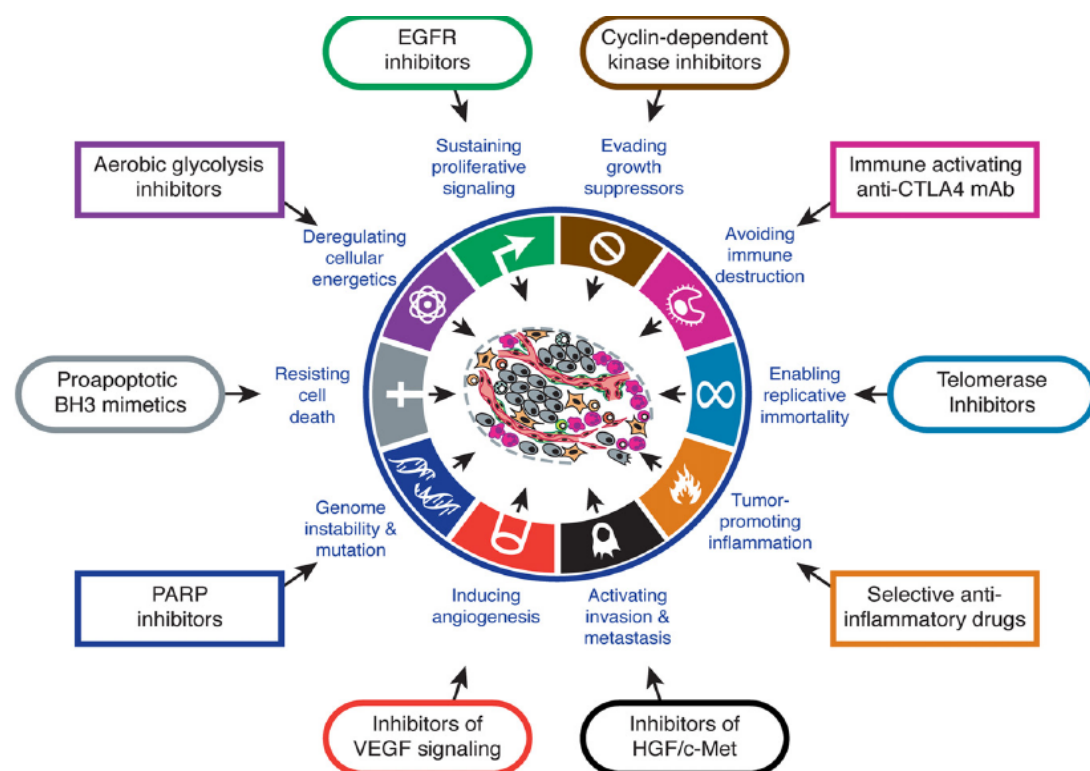
Os fatores emergentes como características definidoras são:

- (1) A capacidade de evitar a destruição do sistema imune;
- (2) O desregulamento de metabolismo do hospede.

Os fatores adicionais foram incluídos e o circuito das influências sobre a célula ganhara uma aparência esquemática.

Os novos conceitos incluíam a capacidade das células tumorais de modificar o metabolismo de hospede para desviar os processos de manutenção normal aos processos tumorais de crescimento contínuo. Adicionalmente estes grupos de células tumorais desenvolveram as capacidades de evitar a destruição mediada pelas células de sistema imune como aconteceria em circunstâncias normais. O ganho de mutações e a inconstância de genoma resultante permitiriam a transformação e a manutenção das características tumorais. Finalmente, o processo de inflamação para combater as infecções normais encontradas pelo hospede pode ser modificado para favorecer as células tumorais. A figura abaixo mostra estratégias possíveis e em desenvolvimento que bloqueiam ou inibem as propriedades de tumores, com o intuito de não danificar as células normais do indivíduo.

De acordo com estes autores, o desafio do câncer hoje está mais definido e estes aspectos colaboram para que novas pesquisas deem continuidade à busca de cura do câncer.



Fonte: HANAHAN e WEINBERG (2011)

Figura 3 - Alvos terapêuticos contra o câncer

Observando esta figura, verificamos que há muitos aspectos envolvidos no desenvolvimento do processo que culminará em câncer.

Para um tumor ter um resultado biológico, todos estes processos precisam se coordenar em um sistema, porque muitos deles acontecem ao mesmo tempo, outros dependem da realização de eventos prévios.

Entretanto, é preciso estudar algumas vias separadamente, caso queiramos estudar mais detalhadamente as características individuais de cada via.

Neste estudo nós concentraremos no grupo de ciclina-kinases, com suas características proliferativas; especificamente a via de PI3K e cinco dos marcadores moleculares envolvidos: PI3K, PTEN, AKT, AKT-fosforilado, e mTOR.

Depois de descrever como funciona a expressão de várias proteínas associadas aos mecanismos moleculares em melanomas cutâneos, foi preciso uma análise mais detalhada sobre a expressão dos marcadores em pacientes com MMC (que se desenvolverão ou não as metástases), na tentativa de demonstrar as possíveis relações entre a via molecular de PI3K e as características histopatológicas dos MMC.

A incidência de melanoma maligno cutâneo tem aumentado significativamente nas últimas décadas na América de Norte, Europa e Austrália, conforme figuras de Câncer UK, 2006, segundo (MICHAILIDOU et al. (2009), 20% destes casos morrem devido a doença metastática. A sobrevida média foi de 6 meses.

XIE et al.(2008) observaram que quase 30% de cânceres humanos, incluindo o melanoma, tem mutações somáticas no gene de PI3K. Destas mutações, 80% apresentaram pelo menos uma das duas mutações (*hotspots*) registrando um aumento notável na atividade de PI3K.

No início desta tese, foi considerada a possibilidade de que as vias envolvidas em crescimento e progressão de melanomas de coróide fossem diferentes daquelas que controlavam os melanomas cutâneos. Observa-se que a via de *RAS* e especificamente as mutações em *BRAF* são infrequentes em melanomas de coróide (EDMUNDS et al. 2003; CRUZ et al. 2003; COHEN et al. 2003; KILIÇ et al. 2004; SPENDLOVE et al. 2004; WONG et al. 2005; ZUIDERVAART et al. 2005). Sabendo que o *RAS* pode influenciar a via de PI3K, escolhemos estudar mais detalhadamente esta via.

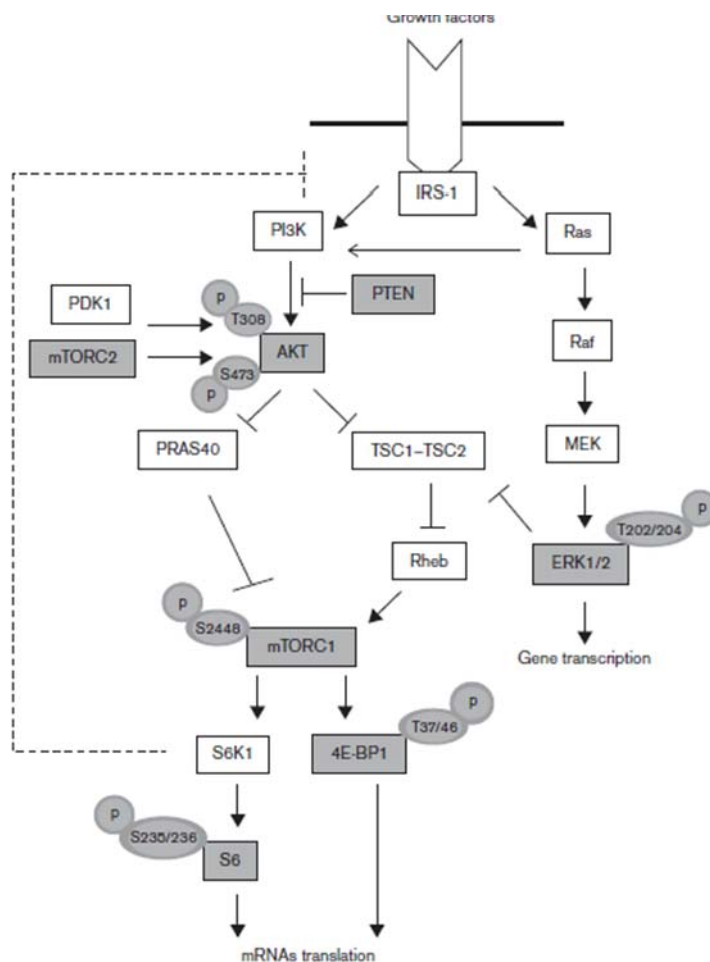
As vias de PI3K para os melanomas cutâneos estão mais definidas que as da úvea. Por esta razão, a discussão teve como foco o primeiro tipo e as informações disponíveis sobre os MMC serão discutidas posteriormente.

A figura seguinte mostra vários genes da via de RAS-MAPK que foram investigados mais detalhadamente nos melanomas de pele. Iniciou-se com a membrana

celular), no *c-KIT*, (envolvido em invasão e metástases), e a perda de supressor de tumores *CDKN2A* (que codifica o p16 INK4a e ARF, ambos envolvidos na progressão do ciclo celular).

As kinases são importantes neste contexto, porque o movimento das células pelo ciclo celular é regulado pela expressão em sequência das ciclinas e ativação dos parceiros os kinases ciclinas dependentes (KHAN et al. 2011).

A via de PI3K-AKT é vital neste contexto assim como as interações com a via de RAS-MAPK como está diagramado na figura abaixo.



Fonte: PÓPULO et al. (2010)

Figura 5 - Vias de mTOR e MAPK, com moléculas efetoras.

- ***c-KIT***

Observa-se em muitos melanomas as mutações no gene de *c-KIT*, um proto-oncogene que codifica três receptores de tirosina kinase. O *KIT* está envolvido no desenvolvimento e maturação de melanócitos normais, (ASHIDA et al. 2009), e parece que o mais prevalente das mutações (de I576P e de K642E) promove a ativação constitutiva do *KIT*, por mecanismos ainda não tão bem conhecidos (GAUDI e MESSINA 2011). Quando o *KIT* se junta com a sua ligante (*stem cell factor*), ocorre a ativação, que por sua vez pode ativar vias de sinalização, como a do gene *MAPK*. Em melanomas cutâneos esporádicos, observou-se que 90 % dos melanomas tinham uma ativação constitutiva da via de *MAPK*, por meio de ativação de *BRAF* (CURTIN et al. 2006).

O grupo de CURTIN et al. (2006) mostrou que houve as mutações ou os aumentos em número de cópias deste gene *KIT* em 39% dos melanomas de mucosa, 36% de melanomas acrais, e 28% de melanomas originando-se na pele danificada cronicamente por sol. Não foi encontrado nenhum caso neste grupo (0%) de expressão de *KIT* de melanomas de pele sem exposição ao sol. É importante salientar que neste estudo, 79% dos tumores com mutações e 53% dos tumores com cópias múltiplas de *KIT* mostraram um aumento do nível de expressão do *KIT*. Os autores sugerem que terapias com drogas como imatinib (*Gleevec*) podem ser úteis no futuro para o tratamento deste tipo de melanoma (CURTIN et al. 2006). O grupo de BEADLING et al. (2008) fez um estudo semelhante e observou as mutações de *KIT* em 23% dos melanomas acrais, 15,6% de melanomas de mucosa, 7,7% de melanomas de conjuntiva, e 0% de mutações em melanomas de coróide (total de 60 casos). Adicionalmente, eles mostraram que não houve uma correlação entre a expressão de CD117(protooncogene cKIT) ou número de cópias do cKIT e a presença de mutação.

Outro grupo em 2003, observou uma positividade na membrana para *cKIT* em 75% das amostras de melanoma maligno de coróide, usando tecidos de tumor fixado por formal e em blocos de parafina. Somente uma das três linhas de células testadas mostrou uma positividade por este *cKIT*, e a positividade de *cKIT* no tumor não foi associada com a sobrevida do paciente (MOURIAUX et al. 2003).

Outros autores, usando várias linhagens de células de melanoma de coróide, mostraram que as células *cKIT* negativas foram resistentes ao efeito de tratamento com *Gleevec* ©. Porém, nas linhagens com *c-KIT* positividade, o *Gleevec* inibiu a proliferação celular, reduziu a transformação das células, e induziu a apoptose via a inibição de *ERK1/2*. Eles concluem que a ativação de *ERK1/2* foi necessária e suficiente para induzir a proliferação e a sobrevida das células malignas (LEFEVRE et al. 2004).

- **CDKN2A E CDK4**

O gene *CDKN2A* é um gene de penetração alta predisposto ao desenvolvimento de melanomas, e foi um dos primeiros genes estudados devido seu envolvimento em melanomas cutâneos. Este gene codifica dois genes supressores para tumores; *p14/ARF* e *p16/INK 4^a*, que são implicados na patogênese de 25-40% de melanoma cutâneo familiar. O *p14/ ARF* tem um efeito indireto sobre *P53*, outro gene supressor de tumores, que promove o reparo de DNA quando for possível, e , quando não for, ative outros mecanismos para efetuar a senescência ou apoptose das células danificadas. Outro gene supressor, *p16/INK4A*, funciona com a proteína Retinoblastoma para regular a entrada de célula na fase G1 do ciclo celular. Outro gene *CDK4* tem um papel adicional, mas menos importante (GAUDI e MESSINA 2011).

-

RAS

As duas vias de Ras/Raf/MEK/ERK e Ras/PI3K/PTEN/Akt mTOR, consistem de cascata de kinases reguladas por fosforização e desfosforização por kinases e fosfatases específicas, também como proteínas de troca (*exchange proteins*) tipo GTP/GDP proteínas adaptadoras e de *scaffolding* (sistema de andaimes). Alterações como mutações ou eventos epigenéticos podem acontecer nestes genes ou em receptores que ficam acima da via. Estas vias são importantes, porque os níveis alterados dos componentes ativados, principalmente níveis elevados, frequentemente estão associados a um pior prognóstico em pacientes com câncer, ou envelhecimento precoce (STEELMAN et al. 2011).

A família RAS de *proto-oncogenes* tem três membros principais, o *HRAS*, *KRAS* e *NRAS*, assim como o *RAF* tem três membros, o B-Raf, C-Raf, e A-Raf. Qualquer um deles, que esteja envolvido na via daquela célula específica pode causar a fosforilação de *MEK1* (*mitogen-activated protein kinase 1*). O *MEK1* ativado causa a fosforização de ERK nos resíduos específicos chamados T e Y. Na forma ativada o *ERK1* e *ERK 2* *serine S/T kinases* podem fosforizar e ativar outros substratos (>600) localizados não somente acima, mas também abaixo de *ERK1/2* na via. Dependente de sítio no *ERK* fosforizado, a fosforização de *ERK* poderia aumentar ou diminuir a atividade e estabilidade de proteínas como B-Raf ou MEK1. Este sistema de *feedback loops* é importante, porque o sítio de fosforização determina para onde a proteína será destinada. Exemplificando, para o núcleo iniciar uma cascata de eventos, ou para degradar a proteína em que momento, a via poderia ficar parado ou desligada completamente.

É importante destacar que há um fluxo de informação para estes eventos de fosforização, que chegam para o núcleo onde são iniciados os programas de transcrição

(*transcription*), modulando a expressão dos genes destas vias. Observa-se que, muitas vezes, os mRNAs que codificam estes fatores de crescimento precisam de ajuda dos efeitos das vias de Ras/Raf/MEK/ERK e Ras/PI3K/PTEn/Akt mTOR operando em conjunto. Este tipo de mRNA chama-se mRNA fraco ou *weak mRNA* porque precisa de ambas as vias para que a tradução seja efetiva. Assim, eventualmente, estas duas vias não funcionam sem a outra (STEELMAN et al. 2011).

A Ras fica ativada por meio de interações de fatores como *Src Homology 2* (Shc) proteína adaptador, ligando com outro fator como por exemplo, VEGFR, EGFR, IGF-RF e outros. Esta primeira ligação causa um agrupamento de GRB2 e SOS (*son of sevenless*) proteínas que têm como resultado final, um enchimento com GTP dos domínios de RAS que fica na membrana celular. Outros receptores de tirosina kinases podem ativar o Ras como GFRTK, e o IR. Desta maneira, a Ras ativada pode recrutar a Raf pela membrana onde a Raf também fica ativada.

A *NRAS* é o gene mais comumente mutado da família *RAS*, em aproximadamente um terço dos melanomas cutâneos primários e metastáticos, cuja presença indica um pior prognóstico. Esta mutação resulta em uma ativação constitutiva da proteína. (GAUDI e MESSINA 2011).

Adicionalmente, as mutações de *RAF*, um efector embaixo de *RAS*, são comuns em melanomas cutâneos. A mutação de *BRAF* acontece em 50-70 % destes tumores, dos quais mais de 90% envolvem uma substituição de valina por ácido glutâmico na posição códon 600 no éxon15 (V600E). Esta mutação tem consequências importantes, porque a mudança de configuração induzida no domínio kinase causa um aumento na atividade desta kinase de 10 até 480 vezes, comparado ao tipo selvagem. Esta mutação, ao induzir uma proliferação descontrolada em melanoma, resultando numa senescência em nevos melanocíticos (KONG et al. 2010).

Embora as mutações em *BRAF* estejam presentes em aproximadamente 50% dos melanomas de pele, esta mutação sozinha não pode transformar os melanócitos em metástases sem a ativação de outra via. Adicionalmente, os nevos têm um nível semelhante de mutação desta kinase, e não desenvolverão a metástase (DAVIES et al. 2009).

DHOMEN et al. de 2009, em estudo usando camundongos, mostraram que com a mutação de *BRAF* (V600E) induzida, aproximadamente 70% dos camundongos desenvolveram mudanças histológicas de melanoma como os vistos em humanos. Estas células foram formar metástases nos pulmões. A presença de p16^{INK4a} não foi necessária para esta transformação (DHOMEN et al. 2009). De outro lado, o grupo de DANKORT não conseguiu demonstrar progressão para o melanoma cutâneo em seu modelo (também de camundongos). Eles acharam somente uma progressão para hiperplasias melanocíticas benignos em período de 15-20 meses (DANKORT et al. 2009).

Ao observar que esta mutação de *BRAF* acontece com alta frequência em melanomas cutâneos, houve uma busca para inibidores. Recentemente foram publicados os resultados de um estudo tipo “Phase III”, usando um tipo de inibidor de *BRAF* chamado *vemurafenib*, comparado a dacarbazina, em 675 pacientes sem tratamento prévio para melanoma metastático de pele, todos com a mutação de *BRAF* V600E. Os resultados aos seis meses mostraram um aumento de sobrevida no grupo com vemurafenib de 84% comparado a 64% pelo grupo tratado com dacarbazina. A vemurafenib foi associada a uma redução de 63% no risco da morte e uma redução de 74% no risco da morte ou progressão de doença. A nova droga foi razoavelmente bem tolerada, sendo que 38% de pacientes precisavam de uma modificação de dosagem por efeitos adversos (CHAPMAN et al. 2011).

Porém nem todos os melanomas têm esta mutação de *BRAF*, e parece mais comum em melanomas originados de lugares específicos, como melanomas de pele não danificada cronicamente pelo sol. Enquanto os melanomas com origem na mucosa ou de tipo acral têm o maior número de mutações em geral, eles raramente têm mutações em *BRAF* (FECHER et al. 2006; POYNTER et al. 2006).

A falta de mutações de *BRAF* em amostras de tumores de melanoma de coróide é conhecida há muito tempo. Um estudo de KILIÇ et al. (2004) mostrou que não houve mutações de *BRAF* em uma amostra de 33 MMC, e em 10 de 11 linhagens comuns de células de melanoma de coróide. Este grupo não observou nenhuma mutação em *RAS* nas mesmas amostras. Esta ausência de mutações em *BRAF* foi confirmada por vários grupos.

Recentemente o grupo de MAAT et al. (2008) mostrou que 6 de 45 amostras (13%) de MMC tinham uma mutação de *BRAF* na posição V600E, usando o método de pirofosforólise ativada de polimerização. Uma análise estatística não mostrou uma influência desta mutação na sobrevida dos pacientes (MAAT et al. 2008).

Em 2008, JANSSEN et al. publicaram seus achados sobre a presença da mutação pontual T1799 (outro tipo menos comum do que a mutação de V600E,) em melanomas primários de coróide que foi observada em 40% dos seus casos de MMC (11 de 30 casos). Um método baseado no PCR em ninhos (*nested PCR based technique*) foi utilizado para mostrar que, apesar de estar presente no tumor, esta mutação não foi distribuída em uma maneira difusa no tumor: houve áreas com mutações e outras áreas que não demonstraram a mutação. O grupo concluiu que a distribuição desta mutação foi heterogênea dentro do tumor. Apesar de não mudar o prognóstico dos pacientes em que houve mutação, os autores sugerem que a presença da mutação de B-Raf pode funcionar no *upregulation* da via de MAPK.

Um estudo de MERHAVI et al. (2007) investigou a presença de metilação do promotor em MMC. Eles buscaram a metilação de novos genes candidatos, que são comumente metilado em melanomas cutâneos, em uma amostra de 20MMC. As taxas de metilação observadas foram 70% para *RASSF1A*, 5% para *MGMT* e *DAPK* e 0% para *RAR-b2*. Para os genes relacionados ao CIMP que define o *CpG Island Promotor Phenotype* (CIMP), as seguintes taxas de metilação foram observadas: 25% para *RUNX3*, 5% para *NEUROG1* e *CACNA1G*, e 0% para *SOCS-1* e *IGF-2*. A positividade para *CIMP* não foi encontrada em nenhuma amostra de MMC. Contudo, os autores sugerem que pode existir uma inativação de *RASSF1A* por mecanismos epigenéticos (MERHAVI et al. 2007).

- **O Gene de *GNAQ***

As proteínas de G (guanine nucleotide-binding proteins) estão sendo estudadas em melanomas. O gene *GNAQ* codifica a sub-unidade de $G_{\alpha q}$. Ela situa-se na membrana celular e é responsável pela transferência das informações dos receptores na superfície para várias moléculas efetores localizadas no interior. Estas proteínas “G” têm um papel importante no controle do metabolismo, respostas neurais e de desenvolvimento. Quando o *GNAQ* fica mutado, há uma mudança de conformação em $G_{\alpha q}$, funcionando o tempo todo. Esta ativação promove um aumento da função de fosfatase C, ativando o “protein kinase C”. A ativação desta proteína pode fazer o mesmo para a via de RAF/MEK/ERK e outras vias. Por este mecanismo, uma mutação em *GNAQ* tem possibilidades ao menos em teoria, para estimular o crescimento das células, incluindo aquelas malignas (PÓPULO et al. 2011b).

Em 2009, VAN RAAMSDONK et al. publicaram os resultados de mutações de *GNAQ* em melanomas de coróide e em nevos azuis(*blue nevi*). O *GNAQ* e *GNA11*-

proteína alfa sub-unidades agiram nas vias de sinalização entre os *G-protein coupled receptors* e os efetores que seguem na via. Eles mostraram que os nevus de cor azul tinham uma frequência de mutações em *GNAQ* de 83% (n=29) e em 46% de melanomas de coróide (n=48). O grupo determinou que as mutações foram somáticas e que foram situadas no códon 209, exclusivamente. O grupo de Harbour mostrou uma porcentagem semelhante de mutações em outro grupo de 67 melanomas de coróide (ONKEN et al. 2008). O grupo de Van Raamsdonk testou o *GNAQ*^{Q209L} em sua capacidade de funcionar com um oncogene in vivo, utilizando os camundongos nus. O *GNAQ*^{Q209L} (mas não o *GNAQ* wt ou melanócitos transfectados como controle) funcionou para induzir os tumores bem pigmentados no sítio de injeção. Quando os autores usaram um *knockdown*, um si-mRNA contra o *GNAQ*^{Q209L} em linhagens diferentes de células derivadas de MMC, observou-se uma diminuição da atividade em níveis de fosfo-ERK, uma diminuição de número de células, e um aumento no número de células na população sub G0/G1.

PÓPULO et al. (2011a), usando uma amostra de 22 MMC's, mostraram esta mutação em 36%; a mutação de *GNAQ*^{Q209P} foi observada em 22,7%, enquanto a mutação de *GNAQ*^{Q209L} ocorreu em 13,6 % dos tumores. Este grupo foi previamente testado pela presença de mutações em *BRAF* e *NRAS*, apresentando negatividade.

O grupo observou, adicionalmente, que não houve correlação significativa entre a presença ou ausência de mutação em *GNAQ* e qualquer variável clínica como idade, gênero, tipo de célula diâmetro e presença de invasão escleral. Nem as medidas de expressão imunoistoquímica de ERK1/2 e de p ERK1/2 202/Tyr204Th¹⁵, nem a expressão de marcadores de proliferação como Ki67 P27, e ciclina D, foram relacionadas com a condição de mutação de *GNAQ* nas amostras (BAUER et al. 2009). Este grupo observou que o estado de mutação (ou não) de *GNAQ* não foi relacionado

com a sobrevida livre de doença, e por isto, o estado de mutação deste gene não pode ser utilizado como indicador de sobrevida.

Contudo, ZIPFEL et al. (2010) mostraram outro marcador que poderia ser ativada da família RAS. Neste artigo, os autores providenciaram evidências para a ativação de Ral-A em linhagens de células de melanoma cutâneo, NRAS e BRAF selvagem. A via de RalGEF é o terceiro efetor de sinalização da via de RAS, em câncer. Uma ativação de RAS promove uma ligação direta com Ral *guanine exchange factors* que resulta em uma transferência para a membrana plasmática, onde é convertido os pequenos GTP-ases Ral A e B para um estado ativado para ligação com GTP. Quando foram eliminados as ações de Ral A por uso de shRNA contra Ral-A, uma diminuição de crescimento de melanomas foi observada. Estes autores mostraram uma elevação dos níveis de Ral A em todas as linhagens de células comparadas as linhagens controles, independente de mutação ou não de NRAS ou BRAF. Adicionalmente mostraram uma diminuição de 55-75% de volume média de tumores induzidos, com um *knock-down* ou eliminação de Ral A ou B por uso de shRNAs (ZIPFEL et al. 2010).

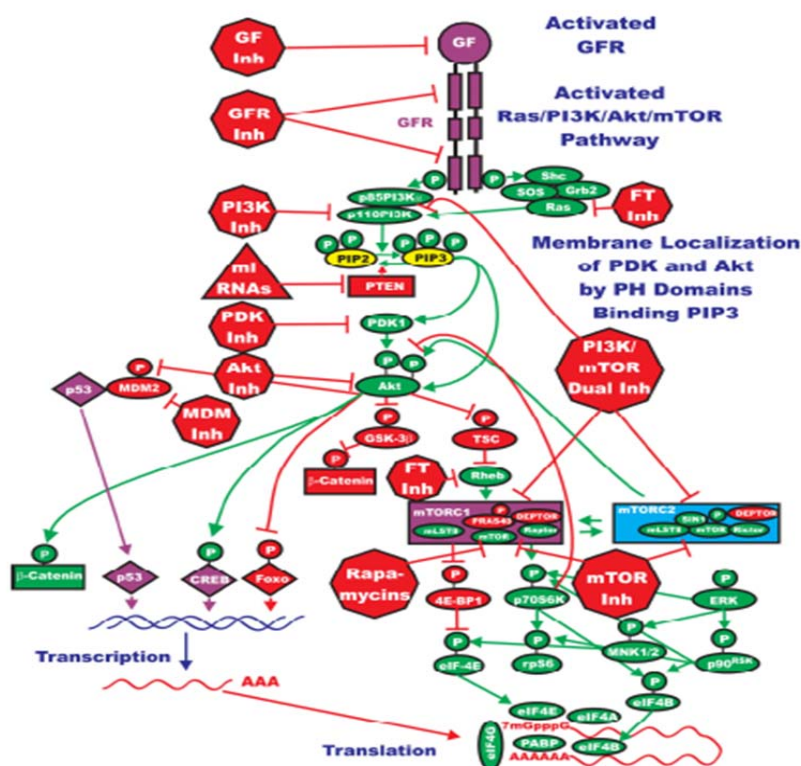
Em 19 de outubro de 2011 (refeito abril 2012) buscou-se *Ral-1 and melanoma*, no PubMed: contudo não encontramos nenhuma referência.

MICHAILIDOU et al. (2009) utilizaram um modelo de melanoma, baseado em um peixe chamado um *zebrafish*. Mostraram uma ativação de ambos as vias para a transformação de malignidade neste modelo. O estudo mostrou que F₁ Peixes tipo *zebra* expressou a mutação de BRAF^{V600E}, e desenvolveram somente a hiperplasia de melanócitos, enquanto os animais F₁ que expressaram uma mutação de RAS (V12RAS) desenvolveram um tipo de melanoma correspondente ao tipo de crescimento radial, semelhante aos humanos, progredindo para uma fase vertical e bastante invasiva. Quando os autores testaram um fenótipo de peixe com uma mutação de RAS

combinado com uma mutação na porção p85 de PI3K, observaram que houve uma redução de 80% de animais com neoplasias comparados ao número de animais que evidenciaram melanomas induzidos com uma perda de V12RAS. Este resultado sugeriu que uma ativação de via de PI3K é necessária, para a continuação da transformação da malignidade induzida pela mutação de V12 RAS. As mutações de NRAS e PTEN parecem se exclusivas em melanomas, porém as mutações de BRAF podem conviver com as mutações de PTEN.

- **Via de PI3K**

A figura que segue mostra um esquema de via de PI3K com possíveis sítios para intervenção terapêutica.



Fonte: STEELMAN et al. (2011)

Figura 6 – Vista geral das vias de Ras/PI3K/PTEN/mTOR com sítios possíveis para inibidores.

- **A família de enzimas de PI3K**

A via de PI3K parece ao lado daquela de RAS-MAPK. Observa-se que a via de PI3K/Akt/mTOR é ativada normalmente para fatores de crescimento e outros, resultando em crescimento celular, proliferação e sobrevivência das células envolvidas, quer sejam células normais quer sejam células tumorais. Várias alterações como mutações, expressão diminuída de PTEN, uma amplificação de AKT ou uma amplificação ou mutação de PI3K, ou ativações de receptores mais acima desta via, podem resultar em transformações para malignidade.

O grupo chamado PI3K é composto de enzimas que fosforiza o grupo 3'-OH nas fosfatidilinosítois. Este grupo se compõe de três classes, cada uma com a sua especificidade para um substrato. O mais ativado em câncer é aquele de classe um (1 A) que existe como um heterodímero de duas subunidades reguladoras, o p85 e p110. A ativação de PI3K acontece por ligação de uma ligadura para o seu próprio receptor. O p85 associa-se às resíduos de tirosina fosforizada neste receptor pelo domínio de *Src homology 2 (SH2domain)*. Quando esta associação acontece, a subunidade catalítica de p110 transfere os grupos de fosfatases para os fosfolípidios da membrana celular. Com esta fosforização as segundas mensageiras, PtdIns (3,4) P2 e PtdIns (3,4,5) P3, são formadas. As PtdIns (3,4,5) P3 (PIP 3) atraem uma série de kinases para a membrana plasmática e iniciam a cascata de sinalização (STEELMAN et al. 2011). O p 110 está mais implicado pela transformação de malignidade (AZIZ et al. 2009).

As mutações da subunidade catalítica de PI3K (P110 α , ou PI3KCA) são as mais frequentes mutações de proteínas kinases em cânceres humanos; sendo mutadas em 25 % de casos de câncer de mama, 30% de cânceres de endométrio, 32 % de casos de colo reto, 27% de cérebro, 25% de casos gástricos, 4% de cânceres de pulmão, 29% de casos de câncer de próstata, e 33% em casos de cabeça e pescoço (STEELMAN et al. 2011).

Muitas destas mutações ficam nas regiões tipo *hotspot* dentro dos domínios de kinases e hélices; e frequentemente resultam em um aumento da atividade destas mutações (LIGRESTI et al. 2009).

Adicionalmente foi mostrado que há um aumento de expressão da via de Ras/PI3K Akt/m TOR em 40% de cânceres de ovário (STEELMAN et al. 2011), indicando uma dependência de uma via sobre outra.

CALVISI et al. (2007) mostraram que uma mutação de PI3K em carcinoma de fígado (hepatocelular) tipo subclasse A (com sobrevida muito menos do que o outro grupo) ocorreu em 50% destes casos, com um aumento na atividade deste marcador.

- **Controle negativo de PI3K por PTEN**

Quando ativado por eventos moleculares, a enzima PI3K fosforiza a posição 3'deinositol PIP2 (*phosphatidylinositol 4,5 biphosphate*) para converte-la em PIP3. Esta PIP3 serve com um mensageiro para recrutar vários efetores mais para baixo da via, que se compõem de domínios de PH (*Plectrim Homology*) como PDK e AKT (3-*phosphoinositide-dependent*” kinase e “*protein kinase B*, respectivamente). A conformação de AKT está alterada na membrana pelo PIP3, permitindo fosforização de AKT por meio de PDK-1 (MADHUNAPANTULA e ROBERTSON 2009). A contribuição de AKT será discutida com mais detalhes depois da discussão sobre PTEN.

A atividade de PI3K tem uma moduladora importante na forma de PTEN. Esta balança de controlo negativo de PTEN sobre PI3K é responsável em parte pelo nível de AKT. A PTEN tem um papel muito importante, porque é a única enzima, e não existe outra fosfatase que pudesse fazer todas as funções de PTEN (LI e ROSS 2007). Por isto, mudanças discretas nos níveis de PTEN por vários fatores, por exemplo, NEDD4-1 que

o regula negativamente, poderia ter influência importante para a carcinogênese (WANG et al. 2007).

- **PTEN e PI3K**

A *PTEN* é um gene supressor de tumores que se situa no cromossomo 10, no sítio 10q24, cuja perda acontece em alguns tipos de tumores como carcinomas de células esquemosas, de tiróide, e de endométrio. Em melanomas tem uma frequência de perda da forma heterozigota de 30-50% (WU et al. 2003). Posteriormente foi reportada como deletada ou mutada em outros tipos, incluindo tumores renais, de bexiga, pulmão, mama, e próstata. É estimado que a ativação da via PI3K-AKT em melanomas por mutações na função de PTEN acontecem em 10-30% dos melanomas (DAVIES et al. 2009). A perda de *PTEN* de linha genética pode resultar em doenças hereditárias como os síndromes de Cowden, Bannayan-Zonana e Lermite-Duclos (SIMPSON e PARSONS 2001).

A *PTEN* é importante por suas interações com o p53; e a inativação ou perda dele por qualquer motivo resultará em uma instabilidade de genoma mediado pelo p53 (LI e ROSS 2007).

A *PTEN* funciona com uma fosfatase contra proteínas e lipídios, mas a sua ação parece mais significativa contra os lipídios. O PTEN funciona em muitos lugares para controlar e direcionar as atividades das células. O *PTEN* interage eletrostaticamente com PIP3 para ligações e hidrólise; pode defosforizar a quinase de adesão focal, que regula a adesão das células, e o Src (*homologous and collagen gene*) com resultante falta de difusão e migração das células. A PTEN pode funcionar como supressor de sinal de MAPK, que modula a adesão de células e age em migração. Com a capacidade

para defosforizar as PIP2 e PIP3, tem um papel no regulamento de proliferação celular, sobrevivência, e apoptose (LI e ROSS 2007).

A perda de PTEN em fibroblastos está associada a um aumento de nível de PIP3 e atividade constitutiva de AKT. A PTEN tem regulação positiva de EGR-1, (*early growth regulated transcription factor*), PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptors*) e p53. Os reguladores negativos incluem MKK-4 (*mitogen activated protein kinase 4*) NF κ B, TGF β , e c-JUN. O mecanismo exato em que estes reguladores inibem a ação de PTEN fica desconhecido (LI e ROSS 2007).

Nos mecanismos de transcrição, há um controle negativo de PTEN, envolvendo mecanismos de controle pós-tradução como fosforização, oxidação dos resíduos de cisteína, ubiquitinação, e acetilação de lisina em outros tipos de câncer.

Adicionalmente, observa-se mecanismos genéticos e epigenéticos para modular a expressão de PTEN.

Dentro dos mecanismos genéticos, inclui-se uma perda do cromossomo inteiro, uma deleção homozigota, uma mutação pontada ou por desvio (*frameshift mutation*), uma deleção tipo *inframe* ou truncada. A perda de cromossomo 10 onde se situa o gene de *PTEN*, tem-se reportado em vários cânceres, incluindo 3-60% de melanomas não familiares. As mutações de *PTEN* acontecem em 12 % de melanomas e com maior frequência em glioblastomas (28%), cânceres de endométrio (34%) e 12 % de cânceres de próstata.

A perda ou inativação de *PTEN* resulta em ativação de *AKT* que induz fosforização e monoubiquitinação de Chk1, causando uma instabilidade do genoma manifestado pelas fragmentações de DNA e finalmente o desenvolvimento de câncer (LI e ROSS 2007).

No outro lado, as mudanças epigenéticas acontecem por meio inerente ao desenvolvimento ou o processo de diferenciação e extrínseco como fatores de ambiente. Em teoria, estas mudanças são reversíveis por tratamento químico ou do ambiente. A metilação de DNA é bem conhecida como um método silenciador de *PTEN* em melanomas (LIU et al. 2008). Adicionalmente os micro RNAs podem agir negativamente; estes estudos foram feitos em cânceres de ovário (YANG et al. 2008).

Nos cânceres de endométrio, houve uma perda da função de *PTEN* em 50-80% dos casos de tipo 1 (endometrióide ou sem oposição de estrogênio). Com uma função sem oposição para *PI3K*, esta perda induzia uma ativação de *Akt*, com um aumento da função de *mTOR*. Por esta razão é postulado que as células deficientes em *PTEN* pudessem ser alvos importantes de inibidores de *mTOR* (BANSAL et al. 2009).

Em um modelo de camundongos com melanomas, o grupo de DANKORT et al. (2009) observou que houve um desenvolvimento para um melanoma com 100 % de penetração em tempo breve, com metástases para os pulmões, com adição dentro do modelo de um silêncio de gene supressor *PTEN*. Com tratamento de um inibidor de *mTORC1* (Rapamicina) ou também de *MEK1/2* (PD325901) houve uma prevenção de desenvolvimento destes tumores. Neste modelo, foi necessário continuar com este tratamento, porque os camundongos voltaram a desenvolver novos melanomas sem o tratamento. O tratamento com ambos os inibidores resultara em uma diminuição de tamanho dos tumores previamente estabelecidos (DANKORT et al. 2009).

A via de *PI3K-PTEN-AKT* está envolvida no processo de malignidade em várias maneiras, não somente por meio de uma via só. Esta via poderia ser ativada pela *NRAS*, como para uma perda de atividade por mutação de *PTEN* (um supressor tumoral) que acontece em 10-30% dos melanomas. Uma mutação de *NRAS* nunca acontece com uma mutação de *BRAF* ou *PTEN*. Uma combinação de mutações em *BRAF* e *PTEN* pode

ser considerada com efeito semelhante a uma mutação de NRAS. Contudo, observa-se que quase todos os tumores com uma elevação de expressão de AKT fosforizado tenham um nível baixo de PTEN.

Os autores deste artigo, observaram que não houve diferenças significativas na sobrevida global dos pacientes categorizados como AKT-fosforizado alto/PTEN baixo, ou AKT fosforizado baixo/ PTEN alto (PU et al. 2011). Por outro lado observou-se que quase todos os tumores com nível baixo de PTEN tiveram um alto nível de AKT fosforizado. Na presença de mutações de NRAS, o nível de PTEN foi normal enquanto o nível de Akt-fosforizado foi diminuído.

Observaram que os tumores com mutação em BRAF tiveram um nível aumentado de AKT-fos-Ser 473, e AKT-fos T308, e GSK α β -fos, do que os tumores com mutações em NRAS. Eles também observaram um aumento de ativação de AKT em metástases do crânio por melanoma. De fato, as metástases de crânio tiveram um nível mais alto de AKT- fos e um nível mais baixo de PTEN comparadas as metástases de fígado e pulmão (PU et al. 2011).

- **AKT e Sua Função**

Uma via envolvida com estas transformações para malignidade é a via de PI3K-AKT. Depois de PI3K na via de PI3K vem o AKT, primeira molécula efetora desta via; A protein kinase B (PKB) e o homólogo funcional de gene de v-akt. Houve três isoformas que, apesar de ter uma semelhança nas sequências altíssima, exibem funções não redundantes. A AKT 1 e 2 tem uma distribuição na maioria dos tecidos enquanto o tipo Akt 3 fica principalmente nos tecidos de sistema nervoso central, incluindo os melanomas. Todos são fisicamente semelhantes, tendo um domínio PH (*Plectrin Homology*); o sítio de PH liga a proteína na membrana para ativação. Dentro da região

central, o AKT tem um número enorme de sítios para kinases; e um sítio para ligação com ATP e dois sítios de ligação para fosforização que se localizam na serina S473 e tirosina T308. Normalmente o AKT fica no citoplasma em uma forma inativa. É um gene de bastante interesse, porque a via em que participa está ativada em até 50% dos tumores humanos e está relacionado, com o desenvolvimento de resistência terapêutica (KIM et al. 2010).

Em melanomas cutâneos foi observado que a forma AKT3 é ativada em 43-60 % de melanomas esporádicos, promovendo a sobrevivência das células e crescimento dos tumores. Este resultado foi feito pelo uso de um pequeno *knockdown siRNA* contra somente AKT3 e não 2 ou 1. Estes autores observaram um aumento da atividade de AKT3 com um aumento de número de cópias de gene *Akt3* e uma diminuição de atividade da proteína PTEN por meio de perda ou estado de heterozigoto (STAHL et al. 2004; KIM et al. 2010).

Observa-se que no AKT3 há diferença de sítios e formas para a fosforização, podendo modificar a forma de ligação. Porém em 2008, o grupo de CHEUNG et al. (2008) mostrou que o Akt3 ajuda com a fosforização de BRAF mutado (V600E) para aumentar proliferação e crescimento sem fixação (*anchorage independente growth*), ajudando no processo de malignidade. Os autores mostraram que uma inibição de ambos o Braf^{V600E} e AKT 3 resultou em uma diminuição do crescimento e desenvolvimento de tumores.

O sítio de fosforização de Akt fica na membrana plasmática de célula, por meio de atração por os $Pt\ dIns\ (3,4)\ P_2$ e o $PtdIns\ (3,4,5)P_3$. Esta mudança para a membrana resulta em uma mudança de conformação que permite o segmento ser capaz de ser ativado e fosforizado. Estes dois sítios são fosforizados pelos *Phosphatidylinositide-dependent kinases (PDKs)* 1, para T308 e PDK 2 que foi chamado PDK2 mas hoje está

conhecido como mTORC2. O mTORC2 se compõe de mTOR combinado com o complexo de mLST8P e outros membros. Existe possibilidade de haver outras kinases capazes de fosforizar este sítio, como a kinase associada à integrina (*integrin linked kinase*) e uma kinase dependente de DNA (*DNA dependent kinase*). Para ser ativado completamente, o AKT precisa de ambas os sítios fosforizados. Porém, quando ativado, o Akt migra para o citoplasma, as mitocôndrias e o núcleo (onde tem papel importante para induzir o apoptose).

A situação sobre a função de Akt fica mais complicada ainda, porque mais de 100 substratos foram identificados, a Akt para que possa agir. Vários deles incluíram a caspase 9, o Bad, MDM2 (*murine double minute 2*) que regula negativamente o p53, o ASK1, (*apoptosis signal-regulated kinase 1*) conhecido como o regulador negativo de opto (a JNK (*cJun N-terminal kinase*), Raf, p53, o substrato PRAS40 (*proline-rich Akt substrate 40*) o S fase kinase associado à proteína 2 (*SKP2 ou S-phase kinase associated protein*), o p27^{Kip1}, o p21^{Cip1}, o kinase de sintase de glicogênio, e a proteína de cAMP de resposta para ligação de elemento (*cAmp response element-binding protein, CREB*). Todos estes substratos têm um papel importante para controlar a proliferação celular, desenvolvimento, e sobrevivência, e a transição epitélio-mesênquima, seja diretamente ou indiretamente, por meio dos outros componentes (MARTELLI et al. 2010; STEELMAN et al. 2011).

A figura abaixo funciona com um sumário de várias ações e interações de Akt.

melanomas avançados. Por isto, acredita-se que a via de PI3K tem um papel importante no progresso de melanomas cutâneos.

Um grupo, investigando a via PI3K em tumores de pulmão (NSCLC), mostrou que as variações genéticas de SNPs dos genes envolvidos nesta via fizeram diferença no risco de progressão de metástases, com três variantes de AKT (fs3803304, rs2498804, e rs 1130214). Estas três variantes deram um aumento de progressão livre de doença de quase duas vezes o que foi observado com outras variantes (PU et al. 2011).

O PI3K (no caso esta atividade não esteja inibida para a ação de PTEN) pode ativar o AKT para se localizar na membrana plasmática. A fosforização de dois lugares no AKT, principalmente por mTORC2, resulta em ativação completa de AKT. Desta maneira, os níveis de AKT fosforizada podem ser utilizados para dar uma estimativa de ativação de PI3K. Uma AKT ativada pode fosforizar outras proteínas celulares como GSK3, os fatores de transcrição de FOXO, MDM2, BAD e outros propiciam a sobrevivência das células e a entrada no ciclo celular. Uma AKT ativada causa a ativação de complexo de mTORC1, que está envolvido em controle de (crescimento e síntese de proteínas (AZIZ et al. 2009).

Neste artigo de DAVIES et al. (2009) mediram os níveis de AKT- fos, o substrato dele, o GSK3 α/β , e o regulador negativo dele, o PTEN, em amostras de melanoma metastáticos (cutâneos). Os tumores com mutação em NRAS tinham um nível normal de PTEN e um nível menor de AKT-fos do que aqueles tumores que tinham uma mutação de BRAF. Observe-se que em tumores individuais, uma expressão de AKT-fos elevada foi associada com uma expressão baixa de PTEN. Eles acharam que nem o nível de expressão de Akt-fos nem de PTEN foi associado com sobrevida câncer específico em pacientes com metástases regionais.

Em células de linhagens de melanomas de coróide, foi mostrada que HGF (hepatocyte growth factor) causa uma migração das células mediada por c-met, e a ativação de AKT foi necessário por isto. Esta ativação da via de PI3K/Akt induzida pela HGF/cmet foi envolvida na diminuição de níveis de E-caderina e β catenina, aumentando a facilidade de migração das células (YE et al. 2008).

Outro controle sobre a atividade de Akt pode acontecer por meio de mTORC1, que atua por meio de p70S6K.

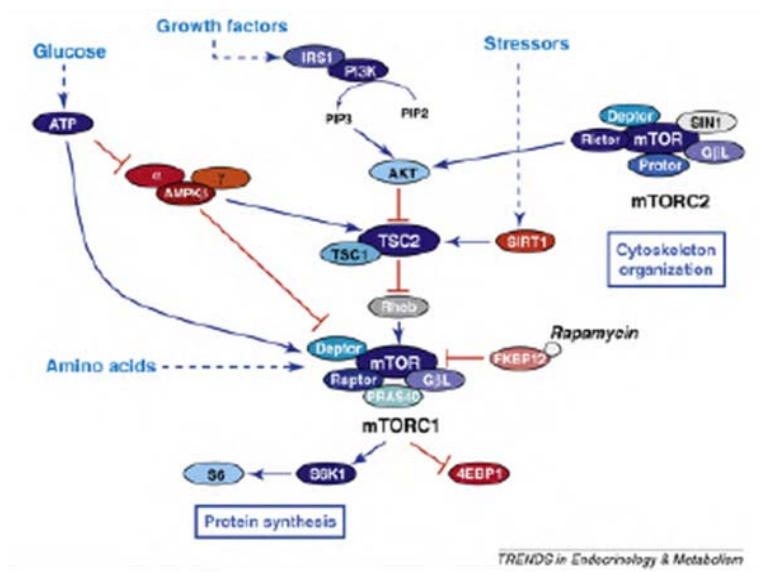
Em 2005 o grupo de SLIPICEVIC et al. mostrou que houve uma expressão seja citoplásmico ou nuclear de Akt-fos em 54% (22/41 casos) de nevos benignos, em 71,3% (112/157 casos) de melanomas cutâneos primários e em 71% (50/70) casos de melanomas metastáticos do todos os lugares. Observaram uma expressão de PTEN no citoplasma em 0% dos nevos, em 87,7% (152/162 casos) de melanomas primários, e em 90% (64/70) casos de melanoma metastáticos. Nem a expressão de Akt-fosforizado no citoplasma nem a expressão de PTEN tiveram diferença na sobrevida global ou livre de doença nestes casos.

Em um estudo de tipos específicos de melanoma cutâneos, PÓPULO et al. (2010) usando métodos imunoistoquímicos, mostraram que os melanomas nodulares e o tipo “superficial spreading” tiveram uma expressão maior de Akt-Fos Ser 473 e pS6 (em baixo de mTOR) do que os tipos “lentigos” e “acrais”.

Um estudo de 2005 por SARAIVO et al. em 34 amostras enucleadas por melanoma de coróide mostrou que houve expressão de Akt-fos em 55,5% (10/18 casos) de enucleações primárias e em 56,9% (9/16 casos) tratados com irradiação antes da enucleação. O grupo achou que a expressão alta de Akt-fos foi associada a um risco maior de desenvolvimento de metástases ($P=0,02$ risco cumulativo de metástases em meses).

Finalmente, o grupo de PÓPULO et al. (2010), mostrou por métodos imunoistoquímicos, que houve uma expressão de Akt em 90% dos casos (ambos no citoplasma como o núcleo) e uma expressão de AKT-fos (ambos os sítios) de baixa para moderado, em somente 58 e 56% dos casos de melanomas de coróide.

- **mTOR**



Fonte: ROA e TENA-SEMPERE (2010)

Figura 8 – O sistema de mTOR.

O mTOR, uma parte da via de PI3K é importante para a célula em termos de sua atividade em proliferação, para o regulamento de energia por metabolismo, a manutenção de citoesqueleto e o crescimento. Esta proteína, membro da família de phosphoinisítide 3-kinase-related kinases (PIKKs) é uma serina kinase atípica é ubíqua em distribuição, e está ativada por vários fatores de crescimento, ácidos aminos, e hormônios como insulina, fator de crescimento semelhante a insulina, leptina, e vários estressores fisiológicos. Esta kinase existe em dois complexos compostos de muitas

moléculas, que ficam em equilíbrio relativo. O primeiro chama-se mTORC1, que está sensível aos efeitos inibidores de rapamicina, e mTORC2, que não responde a esta droga. Houve evidências sugerindo que o mTOR adicionalmente tenha um papel importante no regulamento de balanço de energia, funcionando junto com a leptina no controle de obesidade (ROA e TENE-SEMPERE 2010).

O mTORC1 se compõe de mTOR/raptor/mLST8/PRAS40/FKBP28/deptor enquanto o mTORC2 se compõe de mTOR/Rictor/mLST8/Protor/Deptor, e não é sensível para a rapamicina e análogos de Akt. Na célula, o mTOR fica principalmente na retícula endoplasmática (“endoplasmic reticulum”), o Golgi e as membranas de mitocôndria. O mTOR está ativado por meio de ações e inibições de outras proteínas na via mais para cima. Depois de ser ativado, o Akt funciona para inibir as proteínas TSC2 (*tuberous sclerosis2*) que são proteínas tipo *G activating*. Esta TSC2 funciona em associação com outra proteína TSC1, atividade deste complexo por Akt permite que uma proteína tipo G chamada Rheb se acumule com um estado GTP ligado. Neste estado (Rheb-GTP) pode ativar a atividade de mTOR dentro de complexo de mTORC1 (com raptor). Este mTORC1 pode inibir negativamente o Akt acima, por meio de p70S6K, e seus efeitos no IRS 1 (MARTELLI et al. 2010; STEELMAN et al. 2011). Efeitos adicionais de mTOR foram sugeridos na senescência e envelhecimento. Por exemplo, os inibidores de mTOR como a rapamicina e derivados e a droga Metformin podem inibir o mTOR, resultando em uma inibição de envelhecimento de células (STEELMAN et al. 2011). KOROTCHKINA et al. em 2010 mostraram resultados que favorecem a teoria que a senescência precisa de dois fatores, uma parada de ciclo celular por p53, e uma ativação de via de mTOR, promovendo crescimento das células.

Recentemente o grupo de PANASYUK et al. (2009) descreveu uma isoforma de mTOR, o mTOR β , que pode regular a fase de G1 do ciclo celular (fazendo isto mais

breve) e estimular a proliferação das células. Esta isoforma pode ser responsável pelo regulamento de proliferação celular e progressão no ciclo celular. Este mTOR β pode formar complexos com o Raptor e Rictor que são partes dos complexos de mTOR na forma inteira (mTOR α). O grupo mostrou que um aumento de expressão (*overexpression*), sendo suficiente para induzir tumores pela expressão endógena de isoforma mTOR β em camundongos (PANASYUK et al. 2009).

Um grupo de BABCHIA et al. (2010) investigou o papel de PI3K e mTOR em linhas de células de melanoma de coróide. Observaram que uma inibição de PI3K desativou o sinal de P70S6 (que fica na cascata depois de mTOR) com uma redução em proliferação celular de 71-84%, acompanhado pelo aumento de apoptose de um fator entre 5,0-8,4, e sem redução de atividade de ERK. No mesmo estudo eles observaram que uma inibição de mTOR por rapamicina não causou uma diminuição de proliferação celular, porque isto aumentou a atividade (estimulação) de PI3K/Akt. Estes autores concluíram que os inibidores de mTOR como rapamicina não vão inibir o crescimento de melanomas de coróide.

O grupo de PÓPULO et al. em 2010, estudando TMAs de 84 amostras de melanomas cutâneos, acharam uma expressão significativa entre a expressão de pmTOR e as duas formas de Akt fosforizado (pAKT Ser 473 ($P<0,01$) e pAKTThr308 ($p=0,03$). O pmTOR foi significativamente associado aos dois efetores abaixo de mTOR, pS6 ($P=0,01$) e p4EBP ($P<0,01$). A expressão de pAKT Ser 473 foi significativamente associada a estes dois efetores de mTORC1, pS6 e p4EBP1 ($P<0,01$). A expressão de pmTOR foi positiva com pERK1/2 ($P=0,04$) e também os dois efetores: pS6 e p4EBP1 ($P<0,01$ e $P=0,02$ respectivamente).

Em melanomas oculares, estudados pelo mesmo grupo (PÓPULO et al. 2010) mostraram uma expressão citoplasmática de mTOR de 90% e da forma fosforizada Ser

2448 de 76%, com uma expressão moderada até alta. A expressão de efetores de mTOR foi de 100% por S6 e de 43% dos casos para o Ser 235 e 6.

Os autores mostraram uma associação positiva entre Akt-fos Thr308 e pmTOR Ser2248 de $p < 0,01$ e para pmTOR Ser2448 e seu efetor por baixo, o p4EBP1 Thr 35/6 de $p < 0,01$. Eles investigaram a interação entre as vias de mTOR e de MAPK e acharam uma associação positiva entre a expressão de pAKT Ser 473 e pERK1/2, com um $P=0,03$.

- **FISH por PTEN**

Apesar de todos os avanços na área de diagnóstico e tratamento, a guerra contra o câncer ainda não está perto de terminar. Um dos problemas que ainda persiste é o problema do diagnóstico das lesões suspeitas, especialmente em melanomas cutâneos. Em um estudo de 1997, fazendo uma reavaliação de diagnóstico inicial na Holanda, um painel de peritos achou 14% dos casos diagnosticados como melanoma invasivo, foi benigno, todavia 16,6% das lesões benignas foram reclassificadas como os malignas (VEENHUIZEN et al. 1997). Outro estudo de 2009 estimava um número de um até dois milhões de biópsias necessárias nos EUA. Em 2008 para fazer o diagnóstico correto de melanomas em todos os pacientes com lesões, possivelmente representasse novos casos de melanoma cutâneo “(1 16.500 casos). Estes números ajudam a entender o tamanho do problema de diagnóstico certo de melanomas cutâneos (GERAMI et al. 2009). Há um custo nestes diagnósticos para os sistemas de saúde de qualquer país, além de custo financeiro, há um custo emocional enorme para o paciente que tinha um melanoma, mas foi diagnóstico, por erro, como uma lesão benigna.

As alterações genéticas e epigenéticas permitem mutações heterogêneas, dentro de tumores que clinicamente parecem bem semelhantes. Hoje em dia enfatiza-se o

desenvolvimento de novas classes de marcadores biomoleculares para separar estes tumores um do outro.

Por isto houve três classes de marcadores moleculares importantes, de acordo com BERNARDS (2010). A classe primária se compõe dos marcadores para o prognóstico, para prever o desfecho de doença sem tratamento. O segundo tipo consiste de marcadores prognósticos, e a terceira classe tem os marcadores farmacodinâmicos, capazes de determinar as dosagens dos remédios a serem utilizados.

Para descobrir quais seriam os marcadores biomoleculares mais relevantes e que funcionassem como os alvos terapêuticos, é necessário uma análise dos componentes de tumor. Apesar de permitir uma escolha de uma terapia mais específica para o indivíduo, com uma diminuição das reações adversas e um funcionamento melhor da droga, reduziu-se a prática convencional de “tentativa e erro/certo” usada em muitos casos.

Um dos métodos usados para determinar quais genes poderiam ser envolvidos e o *Comparative Genomic Hybridization* (CGH) que utiliza uma população relativamente pura, das células tiradas do tumor, para um fonte de DNA tumoral. O DNA está isolado, purificado, ligado com um fluoróculo e hibridizado. Com este método, é possível examinar todas as alterações em número de cromossomos de tumor. Os resultados dependem do sítio examinado de tumor: os melanomas inteiros podem incluir células displásicas e nevos (GERAMI e ZEMBOWICZ 2011). O CGH não pode identificar as translocações dentro do cromossomo.

Para evitar alguns problemas envolvidos nesta técnica, o exame de *Fluorescent in-situ Hybridization* (FISH) pode ser utilizado. Por isto, uma lâmina parafinizada convencional pode ser utilizada, com até quatro fluoróculos diferentes. Com este tipo de exame, é possível examinar vários sítios dentro do tumor e correlacioná-los com a morfologia vista por microscópio convencional. Na situação normal, deve-se obter um

sinal duplo do núcleo, indicando a presença de um núcleo diplóide. Como uma sonda feita contra o gene ou marcador de interesse, deveria ter um sinal duplo; quando há aumento de número de cópias de gene, teria um aumento de bolos fluorescentes. Com uma perda de gene, há uma diminuição de bolos desta cor de fluorescência (GERAMI e ZEMBOWICZ 2011).

Para o desenvolvimento de um “kit” comercialmente disponível e em uso na prática clínica, um painel de tumores de melanoma foi avaliado, contando a porcentagem das células com um aumento ou uma perda dos sinais corridos. Usando os dados obtidos desta maneira, e sabendo o diagnóstico histopatológico das amostras, foram determinados as porcentagens de cada um dos marcadores necessário para que a amostra represente um melanoma. Um “kit disponível, de “Abott Molecular” tem os seus valores de perda e ganho estabelecidos de acordo com os parâmetros do próprio laboratório (GERAMI e ZEMBOWICZ 2011).

Um estudo de MOORE e GASPARINI (2011) testaram três amostras com diagnósticos já conhecidos, compondo casos de melanomas malignos, nevos atípicos e nevos benignos, patrocinados por três laboratórios comerciais. Decidiram recalcular os níveis de especificidade com um teste de especificidade, usando um grupo de nevos benignos, com curvas de ROC (*receiver operator curves*) com diferentes níveis o ponto de corte para várias taxas de especificidade (MOORE e GASPARINI 2011). Desta maneira eles determinaram valores que diferenciaram os casos para os quatro marcadores utilizados. Um caso foi considerado positivo com > 16% de células contadas com >dois sinais para o sítio de RREB1 e >22% de CCND1 com >dois sinais, dos valores pelos marcadores foram semelhantes, porém não iguais. Os autores relataram que os valores do ponto de corte que definem a positividade para estes quatro

marcadores do Kit de “Abbott Molecular” podem ser diferentes (MOORE e GASPARINI 2011).

Todavia não existe um critério de referência aplicável para todos os testes de FISH, de qualquer laboratório. Os valores significantes para presença ou ausência de perdas e ganhos, usando o método de FISH estão derivados por tentativa e erro/certo de diferentes laboratórios, havendo influências devido às condições de hibridação, método de quantificação, treinamento dos técnicos, e a sensibilidade e, a especificidade desejada no resultado. Na pesquisa, o FISH está sendo utilizado não somente para o diagnóstico de um tumor, mas também como um método confiável para a determinação de perdas e ganhos de genes, e as translocações, (que não são detectados pelo método de CGH). Por isto, a padronização do método é muito importante, não obstante as variações mencionadas acima. Usando o FISH é possível distinguir outras células de tipo inflamatório ao mesmo tempo, (SENETTA et al. 2011), estudaram o uso de FISH em tumores melanocíticos de “Histopathology”, enfatizando que as variações encontradas na sensibilidade e especificidade de vários autores poderia ser explicada pelos algoritmos diferentes utilizados.

Em 2009, o grupo de GEMARI et al. publicou os seus resultados sobre o uso de um painel das sondas para FISH especificamente montado para a análise de tecidos fixados em parafina. Eles desenvolveram um algoritmo usando as curvas de *receiver operator characteristic* (ROC) com valores de pontes de corte escolhidos para dar a melhor combinação de sensibilidade e especificidade pelas sondas.

BASTIAN et al. (2003) publicaram um dos primeiros estudos, investigando as variações em número de cópias de cromossomos em melanomas usando o CGH em 132 melanomas malignos cutâneos. No estudo, 96% dos melanomas mostraram algum tipo de aberração em números. Este grupo mostrou vários aumentos em número, envolvendo

os cromossomas #6p, 1q, 7p,8q,17q,11q,e 20q. Houve perdas em cromossomos #9p, 9q, 10q, 10p,e 6q. Neste estudo os autores utilizaram a razão de fluorescência de tumor: referência de 0,80 ou >1,2 para o *standard labeling* (etiquetagem padrão) e *reverse labeling* (etiquetagem inverso) ou uma razão de <0,85 ou >1,15 para ambos. Usando esta razão eles consideraram como aberrante os valores abaixo ou acima deste valor. Eles classificaram abaixo de razão 0,85 como perdas e acima de 1,15 como ganhos, baseados em um estudo semelhante (BASTIAN et al. 1998) realizado anteriormente.

Com este método, os autores mostraram uma perda de 36,4% de cromossomo 10q e uma perda de 29,5% de 10 p, considerando todos os tipos de melanomas juntos.

Recentemente, os colaboradores de Bastian (NORTH et al. 2011), utilizavam quatro sondas contra 6p25 (RREB1), o Cep6, (centrômero de cromossomo 6), 6q23 (MYB) e 11q13 (CCDN1) para determinar se as alterações em número de cromossomos poderiam identificar melanomas (em uma amostra com o desfecho do paciente conhecido) com doença metastática. Na primeira parte do estudo, eles utilizaram os critérios de positividade previamente estabelecidos.

Depois ajustaram estes níveis para determinar se existia um melhor nível de positividade para definir aqueles tumores com potencial metastático.

Tabela 1 – Comparação de critérios.

	6p25 Gain	6p25 > Cep6	MybCep6	11q13 Gain
Crítérios de estabelecidos	> 29% cells	> 55% cells	> 40% cells	> 38% cells
Crítérios observados neste estudo indicando metástases	> 28% cells	> 45% cells	> 55% cells	> 11% cells

Fonte: Adaptado de NORTH et al. 2011

Os autores mostraram que uma mudança dos critérios de positividade melhora a predição de metástases acima do valor dada pelos critérios anteriores. Este artigo foi publicado em agosto de 2011, e a meu ver os critérios de positividade por FISH ainda não estão totalmente estabelecidos para os melanomas cutâneos.

(NORTH et al. (2011) observaram que os pacientes com melanoma primário testando positivo pelo FISH, tinham um risco aumentado significativo para o desenvolvimento de doença metastática com um *odds ratio* (razão de Hazard) de 4,11 ($P=0,02$, IC =1,14-22,7). Este grupo tinha um risco maior de morrer destas metástases de 7,0 ($P=0,04$, IC 1,03-300,4) comparado com os casos de FISH negativo. Na análise multivariada, um resultado positivo por FISH deu um risco independentemente aumentado de 5,9 ($P=0,04$, IC 1,06-32,44); porém não houve uma tendência para um FISH positivo que determinasse a morte por metástases.

Há uma escassez de artigos publicados na literatura mundial sobre o uso de FISH para os casos de MMC. Aqueles que existem são principalmente relacionados ao diagnóstico de monossomia 3. Há somente um artigo sobre PTEN e melanoma de coróide, que não utilizou o FISH, e será discutido no final.

O grupo de SISLEY et al. (1990) fez um cariotipagem em seis casos de MMC, e descobrindo a monossomia de cromossomo 3 e 8 em três casos de tumores de corpo ciliar, e alterações em cromossomo 1 em dois casos, com alterações de cromossomo 6 em quatro casos.

Em 1990, um grupo de Essen mostrou algumas anomalias cromossômicas em 14 casos de MMC, tendo um aumento de cromossomo 8 em 8 pacientes, a monossomia de cromossomo 3 em seis casos, e adições e deleções de cromossomo 6 em seis casos (PRESCHER et al. 1990). O grupo de Holanda em 2002 publicou um estudo comparando o FISH com o material de PPAF (punção por agulha fina) em 40 casos

enucleados por MMC e os resultados obtidos por FISH ou CGH, utilizando uma amostra maior derivado pelo tumor inteiro. Eles estudaram as alterações de cromossomos 3 e 8, mostrando uma concordância boa entre os resultados de CGH e FISH, com uma variação em 11 hibridizações, envolvendo 7 casos. Os autores calcularam que somente dois dos 249 (0,8%) das hibridizações poderiam ter resultado em classificação errada da genética do tumor (NAUS et al. 2002).

Em 2005, membros do mesmo grupo publicou um artigo, utilizando a técnica de FISH, mostraram que a perda simultaneamente de braço curto de cromossomo 1 e todo de cromossomo 3 foi um fator prognóstico independente para a sobrevida livre de doença ($P < 0,001$). Esta combinação de perdas cromossômicas foi associada a um risco relativo de quase 7,8 vezes mais risco de doença metastática quando comparado àqueles pacientes que não tinham a doença metastática. Outro fator de prognóstico do modelo múltiplo foi o diâmetro basal; outras variáveis não foram significantes. Este estudo foi feito com amostras de 120 pacientes dos quais 42 tinham morrido (com um seguimento mediano de 45 meses (KILIÇ et al. 2005).

O problema da acurácia com o uso de PPAF parece um assunto recorrente na literatura. Em um estudo de 2007 MATT et al. com 50 amostras de enucleação por MMC, fizeram comparação entre os resultados da monossomia de cromossomo 3 por FISH, feito diretamente com uma lâmina de parafina, e comparado com o FISH feito nos núcleos extraídos das células tumorais. Observou-se uma diferença devido à pigmentação forte de melanina nas lâminas de parafina. Quando eles fizeram a cultura das células tumorais comparados aos núcleos tirados, observaram uma monossomia por cromossomo 3 em 3/19 casos (38%) comparado ao 29/50 (58%) dos casos feito dos núcleos. Os autores relataram que o diagnóstico de monossomia 3 foi feito, utilizando um nível de $>10\%$ de perdas de sinais para os células em culturas. Para os núcleos

removidos o diagnóstico de perda foi feito ao nível de $> 5\%$ perda de sinal (foi obtido com a média dos controlos multiplicado pelo x3 o desvio padrão). Com estes resultados, os autores sugerem que há uma variabilidade na distribuição de monossomia 3 dentro destes tumores. O uso de PPAF para diagnosticar as modificações genéticas poderia estar sujeito ao erro.

Outro estudo dos EUA em 2009, SCHOENFIELD et al., usando 18 casos enucleados, mostrou uma diferença na incidência de monossomia 3 dependente do sítio de amostra dentro do tumor. O grupo acertou que 70% dos casos tinham monossomia na base e também no ápice, enquanto 30% mostraram uma monossomia somente na base (com dissomia na ápice). Esta diferença em monossomia foi observada em seis casos, correspondente a 35% da amostra. Os autores avisaram sobre o problema diagnóstico que esta distribuição pode ter com o uso de PPAF.

Outro estudo sobre monossomia 3, (BRONKHORST et al. 2011), avaliando o desenvolvimento de metástases, mostrou que a incidência de $> 5\%$ perda dos cromossomos 3, por FISH feito nos núcleos isolados do tumor, foi associado significativamente com a presença de metástases em 5 anos ($p=0.007$) e risco relativo foi 15,5 para a morte em 5 anos. Os pacientes com metástases tinham um número de perdas de cromossomo 3 ($P=0,001$).

O FISH para o monossomia 3 pode dar falso negativo. Esta possibilidade foi explorada pelo grupo de Liverpool UK, (LAKE et al. 2010) que examinou 19 casos classificados anteriormente como dissomia 3, mas que desenvolveram as metástases, por método de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*). Observaram por este método, que 2 destes 19 casos, que tinham metástases, foram classificados erroneamente.

ABDEL-RAHMAN et al. (2006) estudaram a expressão de PTEN em MMC, mas não por meio de FISH. Este grupo utilizou IIQ e mostrou uma incidência de negatividade de 16% de uma amostra de 75 casos, observou-se uma coloração fraca em 42,7% e moderado, em 38,2%. O grupo adicionou os casos negativos e fracos para concluir que a incidência de diminuição ou perda da expressão de PTEN aconteceu em 58,7% dos pacientes. Os pacientes negativos por PTEN tiveram uma sobrevida livre de doença menor que aqueles que tiveram com uma expressão moderada ($P=0,29$).

O grupo observou uma deleção de PTEN em 15% dos casos, por meio de CGH. Um estudo de perda de heterozigoto (LOH ou *loss of heterozygosity*) indicou que 76,3% dos casos tinham perdido ao menos um dos três marcadores genéticos para o PTEN. Em quase 40%, pelo menos dois marcadores para o PTEN mostraram uma perda de heterozigoto. Para investigar estas perdas mais detalhadamente eles utilizaram mais marcadores e concluíram que houve uma deleção submicroscópica na região de PTEN. Os autores consideram que esta deleção pequena seja o mecanismo mais importante de inativação de PTEN. Mencionaram que este silenciamento de PTEN pode acontecer por mecanismos epigenéticos (ABDEL-RAHMAN et al. 2006).

Como já foi mencionado, não existem dados publicados sobre a epidemiologia de MMC aqui no Brasil. Por este motivo, foi necessário arrumar e analisar os dados clínicos de todos os pacientes de nossa amostra, com variáveis como idade, sexo, tempo para o diagnóstico, e muito mais, como é descrita na parte de Materiais e Métodos. Esta análise não foi uma parte do projeto original; porém, estes resultados não foram disponíveis para os pacientes tratados aqui. Para ter dados clínicos a cruzar com os dados moleculares, foi necessário fazer também, este trabalho. Por esta realidade, a tese tem duas partes.

2 OBJETIVOS

- 1 Estudar as expressões imunoistoquímicas das proteínas da via PIK3 (PTEN, AKT, AKT fosforilado e mTOR);
- 2 Estudar as alterações do gene *PTEN* por FISH;
- 3 Determinar as principais características demográficas e histopatológicas dos melanomas de coróide diagnosticados e enucleados no Hospital A.C. Camargo no período de 1988 a 2005;
- 4 Correlacionar os dados de imunoistoquímicas com achados clínicos e histopatológicos dos melanomas malignos de coróide;
- 5 Correlacionar os dados de imunoistoquímicas com a sobrevida global dos pacientes e nos melanomas de coróide com e sem metástases.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Os dados clínicos de todos os pacientes tratados sequencialmente para uma enucleação de olho (seja primária ou secundária) feito pelo Departamento de Oftalmologia durante o período de 1988 até 2005 inclusive, foram selecionados retrospectivamente dos arquivos de HACC, São Paulo, Brasil. Todos os pacientes com exceção de uma paciente do Paraguai, tinham vivido no Brasil a vida toda ou no caso de alguns, quase a vida toda. Dados de pacientes tratados antes de 1988 foram excluídos, porque o formol tamponado foi introduzido como o fixador normal do departamento de Anatomia Patológica. Os critérios de inclusão foram os pacientes tratados no HACC no período de 1988 até 2005, entre estas datas, com dados suficientes para ser analisados clinicamente.

Para os marcadores, somente os pacientes com tecidos suficientes nos blocos de parafina foram selecionados, correlacionando-se com os dados clínicos. Os blocos de parafina foram resgatados dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica de HACC. As lâminas existentes de Hematoxilina e Eosina foram examinadas novamente para escolher a área de interesse, que foi marcada com caneta permanente. Quando não houve lâminas, uma nova lâmina foi preparada e corada pela técnica de H&E e marcada com caneta. Estes sítios marcados foram tirados com uma agulha CE calibre 1 mm, e confeccionou-se em uma lâmina específica de TMA (microarranjo de tecido).

Controles internos positivos e negativos sempre foram incluídos nas lâminas de TMA para acertar a marcação dos anticorpos.

3.2 VARIÁVEIS CLÍNICAS

As seguintes variáveis foram documentadas para ser avaliadas nesta tese: Idade, sexo, raça, queixa principal, tempo de queixa até o diagnóstico, as dimensões de tumor em mm medidos por ultrassonografia ou tomografia computadorizada, tipo de célula predominante na histologia, data de diagnóstico, data de tratamento primário seja enucleação primária ou braquiterapia, data de descoberta de metástases, data de última visita, estado na última visita, data de óbito.

A fim de determinar se houve ou não diferenças de expressão dos marcadores moleculares, a avaliação dos pacientes foi feita em duas etapas. Primeiramente, os pacientes foram divididos por gênero e depois por presença ou ausência de metástases.

Com estas divisões, as avaliações sobre as seguintes variáveis foram feitas:

- *Variáveis*
 - 1 Número de pacientes homens sem e com metástases;
 - 2 Número de pacientes mulheres sem e com metástase;
 - 3 Raça dos pacientes;
 - 4 Queixa predominante;
 - 5 Tempo em meses entre a queixa a o diagnóstico formal;
 - 6 Dimensões de tumor, usando medidas obtidas antes de tratamento por ultrassonografia ou TC, incluindo DBL (Diâmetro basal longitudinal), DBT (Diâmetro basal transversal) e altura;
 - 7 Tipos de células predominantes encontradas na histologia;

Volume estimado de tumor:
- Divisão e re-análise de tamanho de tumor, baseada no esquema de COMS, utilizando os critérios de COMS de 1990 (MARGO 2004) que foram as

seguintes: *Small size tumors* ou tumores de pequeno porte: <3mm altura e 5 até 16 mm em diâmetro; *Medium size tumors* ou tumores do médio porte: 3,1mm até 8 mm altura com diâmetro até 16 mm; *Large tumors* ou tumores de grande porte: > 8 mm em altura e >16 mm diâmetro (MARGO 2004). O sítio de tumor raramente foi indicado, não sendo possível incluir os tumores menores de 2 mm do nervo óptico como tumores grandes (como foi feito pelo COMS). Os tumores deste estudo foram designados somente pelo tamanho.

- O método de Gass para calcular facilmente o volume representa a tentativa de determinar o volume. A fórmula é: $\text{Pi}/6 \times \text{extensão} \times \text{largura} \times \text{altura}$ (*length x width x height*) onde $\text{Pi}=3,14$ (SINGH et al. 2007), tempo de sobrevida global em dias (ambos os grupos sem metástases e com metástases)
- 8 Tempo até a morte por Câncer (Sobrevida Câncer Específica);
- 9 Tempo livre de metástases em meses (tempo livre de doença) ou tempo de diagnóstico até o diagnóstico de metástases;
- 10 Tempo com doença metastática (meses).

3.3 CONSTRUÇÃO DOS TISSUE MICROARRAY (TMA)

Blocos representativos dos tumores selecionados para este estudo foram resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica. Novos cortes histológicos foram obtidos quando necessário, e corados com hematoxilina-eosina (HE). Procurou-se, por meio do exame de microscopia óptica, as áreas representativas do tumor foram identificadas e marcadas, com caneta permanente. Utilizando o *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Manual Tissue Microarrayer Model MTA-I, Sun Prairie, Wisconsin USA) foram extraídos os cilindros das áreas mais representativas dos

tumores e transferidos em novos blocos de parafina para montar o TMA. Um sistema de coordenadas foi usado para determinar a posição exata dos casos. O sistema de coordenadas, a partir de tabelas em Excel, foi utilizado para a determinação e identificação exata dos casos no TMA, tendo como referência o cilindro de tecido hepático.

Cortes histológicos destes blocos foram obtidos e dispostos em lâminas adequadas para posterior realização dos estudos com imunoistoquímica.

Três blocos de TMA foram montados com os casos de melanomas já selecionados. As áreas representativas dos tumores foram retiradas dos blocos doadores em fragmentos de um mm de diâmetro e dispostas em duplicatas nos blocos receptores.

Imunoistoquímicas foram realizadas para a padronização dos anticorpos P13K, PTEN, mTOR, AKT, AKT fosforizado em 6 lâminas de melanomas do tipo fusiforme, epitelióide e misto. Para melhor interpretação da imunoistoquímica utilizamos a marcação por fosfatase alcalina, evitando-se assim falsos positivos induzidos pela pigmentação de melanina. Por isto a decisão foi tomada para não utilizar DAB, mas usar o *Permanent Red* (Dako) como substrato cromógeno.

Foi decidido ler as lâminas por olho nu, ao invés de utilizar uma máquina (ASIS), que não foi padronizada para ler o *Permanent Red*.

3.4 REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

Para as reações imunoistoquímicas, utilizou-se o método do polímero marcado com fosfatase alcalina. Os passos técnicos que foram utilizados são os descritos na literatura.

O protocolo está descrito passo a passo:

1. Desparafinização dos cortes histológicos com três mm de espessura, do material incluído em parafina e colocado em lâminas carregadas eletricamente, e deixado em estufa a 60° C por 24 horas;
2. Incubação em xilol a temperatura de 60 graus por 20 minutos e depois na temperatura ambiente por 20 minutos. Isto foi seguido por três passagens em etanol (100%, 95%, 70%) por um minuto cada e lavagem em água corrente por cinco minutos;
3. Recuperação antigênica por calor (panela de pressão Tramontina (modelo *Rapid Express*), em solução tampão Citrato pH 6,0 à pressão máxima por três minutos na panela de pressão convencional;
4. A panela foi colocada abaixo de água corrente para despressurizar. Lavagem das lâminas em água corrente por cinco minutos;
5. Bloqueio da peroxidase endógena com água a 3% (água oxigenada 10 volumes) por 10 minutos;
6. Lavagem das lâminas em PBS por cinco minutos;
7. Incubação com anticorpo primário por 30 min a 37 °C , em câmara úmida; e depois por 18 horas a 4 °C ;
8. Lavagem em tampão PBS por três minutos (três repetições);
9. Incubação com Dako Cytomation EnVision (registered trademark-AP Mouse/rabbit Labelled Polymer código K4018 Carpintera, Calif, USA) por 60 minutos Isto é um sistema de amplificação da reação; (AP=alkaline phosphatase). Aqui a enzima é AP que liga com o anticorpo primário seja camundongo ou coelho. A levamisole funciona para bloquear a AP endógena dos tecidos. Adicionalmente a enzima AP liga com o *Permanent Red* (Dako

Código K5355 Danemark) que é o substrato que revela a reação para que possamos ler no microscópio.

10. Lavagem em tampão PBS por 5 minutos por três vezes de cinco minutos cada.
11. Revelação das reações com solução, o substrato cromógeno *Permanent Red* de Dako, Código K5355 por cinco minutos. O progresso da reação foi examinado cada dois minutos no microscópio. O cromógeno foi misturado com 1 ml de tampão de substrato mais 10 microlitros de cromógeno, e 40 microlitros de levamisole, Dako Código X 3021 y (DakoCytomation Levamisole Endogenous Alkaline Phosphatase inhibitor). Se fizer muito frio vamos fazer a 37, °C mas se fizer calor a temperatura será ambiente. (Foi na temperatura ambiental).
12. Lavagem das amostras em água corrente e destilada por cinco minutos;
13. Contra coloração com Hematoxilina de Harris por até cinco segundos;
14. Lavagem em água corrente e destilada por cinco minutos;
15. Deixar na água amoniacal 0,5%-só mergulhar e depois lavar de novo com água corrente e depois água destilada.
16. As lâminas foram montadas em “Aquatex” reg trademark de Merck, fabricado em Darmstadt, Germany. Coberta por lamínulas.
17. Os anticorpos utilizados foram os seguintes:
18. PI3K de Abcam Ab82162-7 não houve diluição; foi vendido pronto para usar; (Abcam Cambridge Mass. EUA)
19. AKT-1 de Cellsignaling diluição 1/1000; (Clone 2H10, Código 2967, Danvers, Mass. EUA).
20. PTEN de Cascade com diluição de 1/250; (Clone CH2.1 Código ABN 2052, Winchester, Mass, EUA)

21. mTOR de Abcam com diluição de 1/100, (Código ab59299, Cambridge, Mass EUA).
22. mTOR de Millipore com diluição de 1/100; (Clone 04-385, Billerica, Mass.EUA)
23. Montagem das lâminas.

As reações foram acompanhadas de controles positivos, tumores de mama para mTOR, AKT para carcinoma de colo, PI3K para de câncer de mama, PTEN para câncer colo retal e o controle positivo para fos akt foi de câncer de mama.

Os Controlos negativos foram feitos por omissão de anticorpo primário.

Todos os controles positivos foram feitos, utilizando tecidos sabidamente positivos para os anticorpos testados, e controles negativos foram incluídos na própria TMA. A leitura das lâminas foi realizada por olho nu e o critério utilizado para positividade foi estabelecido de acordo com a categorização descrita para cada anticorpo pesquisado.

A expressão protéica de PI3K, PTEN, AKT, f-AKT (AKT fosforilado) e mTOR, foram pesquisados pelas técnicas descritas.

Para leitura de IIQ foi usado o seguinte.

Intensidade de marcação:

0=negativo

1=fraco

2=moderado

3=forte

Frequência (área envolvida com células marcadas):

0=negativo

- 1.=0-25%
- 2.=26-50%
- 3.=51-75%
- 4.=76-100%

A leitura de todos os fragmentos foi feita, o número de fragmentos selecionados foi anotado, o escore total foi determinado somando o escore de intensidade com frequência para todos os fragmentos dividindo-se o total pelo número de fragmentos selecionados. Para avaliar no final, agrupamos os tumores que tinham uma marcação total de 0 ou 1 como negativo e aqueles com marcação 2 ou 3 como positivo.

Duas lâminas de cada bloco de TMA foram submetidas às reações de hibridação *in-situ* fluorescente (FISH) para o gene PTEN (Kreatech™), seguindo o protocolo abaixo:

3.5 PROTOCOLO DE REAÇÃO DE FISH

Primeiro dia

- 1- Desparafinização em Xilol, -três banhos de 10 minutos cada;
- 2- Passagens em álcool – três banhos de cinco minutos cada;
- 3- Passagem em água destilada – três banhos de dois minutos cada;
- 4- Banho em solução 0.2N HCl – por 20 minutos à temperatura ambiente;
- 5- Pré-tratamento em Citrato pH 6,0 - 80° C em banho-maria por uma hora;
- 6- Digestão enzimática com pepsina (pronta pra uso) por oito minutos à temperatura ambiente (tempo variável em decorrência do tipo de tecido);
- 7- Lavagem em solução de 2 X SSC por dois minutos à temperatura ambiente;

- 8- Desidratação em álcool, 75%, 80%, 100% por dois minutos cada;
- 9- Secagem das lâminas ao ar;
- 10 Aplicação da sonda: 10µl e incubação no Hibridizador para Denaturação e Hibridização (tempo e temperatura é variável dependendo da indicação do fornecedor da sonda). Obs. Cobrir os cortes com lamínula e aplicar selante em volta. Obs.: Aplicar a sonda ao abrigo da luz.

Segundo Dia

- 10- Pré-aquecer solução de 1,5M UREA/0,1 x SSC em banho-maria à 45°C;
- 11- Mergulhar as lâminas em solução de UREA/ 0,1 x SSC – 45°C por 30 minutos;
- 12- Lavar em solução 2xSSC por 2 minutos à temperatura ambiente;
- 13- Desidratação em álcool 75%, 80% e 100% por dois minutos cada;
- 14- Secagem das lâminas ao ar;
- 15- Aplicar 15µl DAPI, montar com lamínula.

Leitura das Lâminas de FISH para PTEN

A leitura das lâminas de FISH foi sendo realizada, utilizando-se o microscópico de fluorescência da Olympus. Para a interpretação do gene PTEN, a cor verde representa o cromossomo 10, (onde o PTEN se situa no 10q23). A cor vermelha representa o gene PTEN. A célula normal tem dois pontos verdes (centrômeros) e dois pontos vermelhos (duas cópias do gene PTEN). (Abbott Molecular, Vysis, Des Plaines IL, EUA)

Definições usadas neste estudo:

Usamos o esquema utilizado para a pesquisa de PTEN nos tecidos de mama, por falta de algum padrão na literatura, utilizado para melanomas de coróide.

Amplificação: (do gene PTEN) = dois pontos verdes com $\geq$ seis pontos vermelhos.

Deleção (do gene de PTEN): ausência ou presença de somente um ponto vermelho

Trissomias (cromossomo 10):= três pontes verdes

Polissomias (de cromossomo 10): $\geq$ quatro pontos verdes.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos pacientes foram documentados em uma planilha de Microsoft Excel (2003), e analisados, usando Graph Pad Prism V 5 e o programa de “R”.

A análise estatística foi feita usando análise descritiva, porcentagens, média mediana para dados categóricos, incluindo os testes não paramétricos como o Mann Whitney, o Kruskal Wallis, e o Chi quadrado (incluindo Fisher). O teste de Kaplan Meier, Log Rank Mantel Cox, e Gehan Breslow Wilcoxon foram utilizados para avaliar a sobrevivência. O método de Cox (*Cox Proportional Hazards Model*) foi utilizado para o modelo múltiplo.

4 RESULTADOS

Principais características demográficas e histopatológicas dos melanomas de coróide diagnosticados e enucleados no Hospital A.C Camargo no período de 1988 a 2005.

4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS, HISTOLÓGICOS E CLÍNICOS

4.1.1 Casuística Clínica

Um total de 285 casos consecutivos foi incluído na análise clínica. Os dados iniciais foram colocados para todos os pacientes para cumprir com os objetivos de tese. Este número está muito acima do número de casos tipicamente reportado na literatura, e por motivos relacionados com a avaliação dos marcadores, estes pacientes foram avaliados posteriormente: homens versus mulheres, e homens e mulheres sem ou com metástases. Quando não houve diferença significativa entre os homens e mulheres para a variável avaliada, os casos foram reavaliados juntos. Resumida dos resultados:

- Número de homens em total: 138; sem metástases=90, com metástases=47;
- Número de mulheres em total=147: sem metástases=84, com metástases=64;
- Raça; 227 branca; 15 parda; 2 asiática;2 negra;
- Intervalo entre a queixa e o diagnóstico: em total média de 9,6 meses, sendo uma média de 10,7 meses para os homens comparados aos 8,5 meses para as mulheres;
- Dimensões tumorais em geral: Médias de: Diâmetro Longitudinal maior =13,81mm, Diâmetro transversal maior= 12,31 mm, altura = 9,13mm;

- Células predominantes nos tumores: fusiforme sem metástases = 61, com metástases 23; epiteliode sem metástases=29, com metástases 32, mistos sem metástases= 70, com metástases=50;
- Volume calculado pelo método de Gass: Média =1003,18 mm³ total, sendo um volume de 885,9 mm³ em tumores sem metástases, e de 1230,9mm³ com metástases;
- Sobrevida câncer específico em cinco anos: Homens 77% e Mulheres 70%;
- Sobrevida livre de doença em cinco anos: Homens 65% e Mulheres 54%;
- Sobrevida com doença metastática =44,61 meses, com uma taxa de metástases de 39%.

- **Gênero**

Do total de 285 pacientes, 138 (48,42%) foram homens e 147 (51,57% foram mulheres. A idade (variou entre 11 e 87 anos), com uma média de 52,91 anos para os homens e 53,67 anos para mulheres: a idade média deste grupo de 285 pacientes foi 53,27 anos (IC95% 51,58-54.97).

Tabela 2 – Gênero de Casuística Total.

Gênero	n	(%)
Feminino	147	52
Masculino	138	48
Total	285	100

- **Idade**

Tabela 3 - Idade de casuística total.

Idade	n	média	desvio padrão	mínimo	mediana	máximo
geral	285	53	15	11	55	87
homens	147	54	16	11	55	87
mulheres	138	53	13	22	54	83

A idade entre os pacientes que não desenvolveram metástases e aqueles que tiveram metástases, foi quase estatisticamente significativa. Os pacientes com metástases tinham idade um pouco maior.

Tabela 4 - Comparação de idade versus presença de metástases.

Variável	Metástase	n	média	desvio padrão	mínimo	mediana	máximo	p
Idade	não	177	52.0	15.6	11	52	87	0.05
	sim	108	55.6	12.5	22	57	86	

Os dados seguintes indicam a raça declarada de todos os pacientes.

Tabela 5 – Raça indicada no prontuário.

Raça	n	(%)
Branca	227	92
Parda	15	6
Asiática	2	1
Negra	2	1
Total	246	100

- **Intervalo entre as queixas e o diagnóstico**

O intervalo entre as queixas e o diagnóstico foi de 9,6 meses para todos os pacientes; os homens demoraram mais tempo do que as mulheres para obter um diagnóstico.

Tabela 6 – Intervalo de queixas até o diagnóstico de MMC.

Intervalo de Queixas	n	média	desvio padrão	mínimo	mediana	máximo
geral	263	9.6	28.9	0.3	4	408
homens	133	10.7	38.5	0.3	4	408
mulheres	130	8.5	13.1	0.3	4	84

Intervalo de queixas até o diagnóstico em pacientes que ficaram sem metástases e aqueles que as desenvolveram.

Tabela 7 - Intervalo de queixas até o diagnóstico em pacientes que desenvolveram e não desenvolveram metástases.

Variável	Metástase	n	média	desvio padrão	mínimo	mediana	máximo
Intervalo de queixas	não	160	12.3	36.4	0.3	5	408
	sim	103	5.5	7.0	0.3	4	48

- **Tratamento primário e secundário**

Todos os pacientes foram tratados por braquiterapia ou por enucleação primária (na maioria dos casos) devido ao crescimento do tumor.

Tabela 8 - Comparação entre o número de pacientes tratados pela enucleação primária ou por braquiterapia.

Tratamento	n	(%)
Braquiterapia + Eucleação	70	25
Enucleação	215	75
Total	285	100

Tabela 9 - Incidência de metástases em pacientes tratados com braquiterapia e enucleação, comparando com aqueles tratados por enucleação primária.

Tratamento	Metástase		Total	p
	Não (%)	Sim(%)		
B+ES	45 (25)	25 (23)	70	0.67
EP	132 (75)	83 (77)	215	
Total	177	108	285	

- **Histologia de todos os casos**

Quanto a histologia, o tipo misto foi mais comumente encontrado no grupo total.

Tabela 10 - Histologia da célula predominante na casuística.

Histologia	Metástase		Total N	p
	Não (%)	Sim (%)		
fusiforme	61 (73)	23 (27)	84	0.008
epitelióide	29 (48)	32 (52)	61	
misto	70 (58)	50 (42)	120	
necrótico	9 (82)	2 (18)	11	
Total	169	107s	276	

Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os números de pacientes com tumores, principalmente fusiformes x mistos e fusiformes x epitelióides, em termos de desenvolvimento de metástases, mas não entre os tipos epitelióides x mistos.

Tabela 11 - Volume de tumor (sem e com metástases) comparado ao tipo de célula histológico

Tipo Histológico	Volume Sem Metástases (mm ³)	Volume Com Metástases (mm ³)	Valor de P
Fusiforme	776,6	1206	0,0804
Epiteliode	860,3	898,3	0,6147
Misto	1025	1246	0,0592

- **Dimensões dos tumores em mm**

As dimensões medidas dos pacientes pela ultrasonografia ou por meio de tomografia computadorizada foram expressas na Tabela 12.

Tabela 12 - Dimensões dos tumores em mm./mm³

Dimensões	n	média	desvio padrão	mínimo	mediana	máximo
Longitudinal(mm)	253	13.81	4.02	1.94	13.77	32
Transversal (mm)	252	12.31	3.78	1.93	12.055	30
Altura (mm)	251	9.13	4.05	0.84	8.53	30
Volume Gass (mm3)	252	1003.18	1197.57	1.65	745.28	15079.64

O volume destes tumores foi calculado, utilizando o método de Gass e deu uma média de 1.003,18m (mediana 745,28 mm³, e mínimo e máximo de 1,65-15.079,64 mm³).

As tabelas que seguem mostram que todas as medidas foram maiores em pacientes que desenvolveram metástases do que aqueles que não tinham metástases durante o tempo de seguimento.

Tabela 13 - Variáveis clínicas, comparando os pacientes com e sem metástases Variáveis vs Metástase.

Variável	Metástase	n	média	desvio padrão	mínimo	mediana	máximo	p
Idade	não	177	52.0	15.6	11	52	87	0.05
	sim	108	55.6	12.5	22	57	86	
Largura	não	153	13.1	3.8	1.94	13	25	0.001
	sim	100	14.9	4.1	4.12	14.91	32	
Transversal	não	153	11.8	3.7	1.93	11.82	20	0.01
	sim	99	13.1	3.7	2.39	12.59	30	
Altura	não	153	8.7	3.8	0.84	8.49	22	0.04
	sim	98	9.8	4.3	2.19	9.34	30	
Volume	não	153	855.9	761.3	1.65	631.25	3769.91	0.03
Gass mm ³	sim	99	1230.9	1639.6	11.29	864.27	15079.64	

4.1.2 Marcadores

Avaliou-se os blocos de 1988 até 2005. Na análise estatística comparou-se os anos divididos em blocos de cinco anos, com os valores de casos negativos comparados com aqueles positivos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores obtidos por divisões em grupos de cinco anos. Conclui-se que a idade de bloco (principalmente em termos de qualidade de fixação durante a preparação, não foi um fator importante. (p=0.21)

Tabela 14 - Tabela, mostrando os resultados positivos e negativos dependente de ano: Positividade de AKT.

Ano_Diagnóstico	negativo		positivo		Total	p
	n	(%)	n	(%)		
1986-1992	37	71	15	29	52	0.21
1993-1997	63	79	17	21	80	
1998-2001	50	83	10	17	60	
2002-2005	12	63	7	37	19	

Esta tabela foi calculada para mostrar que não houve diferença significativa em termos de ano em que o bloco foi processado (em termos de formol tamponado).

Os marcadores foram descritos como negativo ou positivo. A tabela abaixo mostra as proporções encontradas para o grupo total dos pacientes em que foi possível obter valores. A grande proporção dos casos foi negativa pelos marcadores.

Tabela 15 - Positividade e negatividade para os marcadores utilizados.

Marcador	negativo		positivo		Total
	n	(%)	n	(%)	
AKT	162	77	49	23	211
AKT fosfo	140	73	53	27	193
PI3K	180	89	23	11	203
PTEN	166	84	32	16	198

Os TMAs de mTOR foram feitos utilizando um anticorpo de fabricante Abcam pelo primeira lâmina de TMA e de Millipore pelas lâminas de TMA #2 e #3. Para acertar que os dois funcionaram do mesmo jeito, decidiu-se comparar os resultados de ambos por meio de um teste de Qui Quadrado.

Tabela 16 - Comparação de valores de positividade e negatividade de dois fabricantes de marcador para o mTOR.

TMA	mTOR		Total	p
	negativo	positivo		
A	113 (94)	7 (6)	120	<<0.001
B ou C	32 (37)	55 (63)	87	
Total	145	62	207	

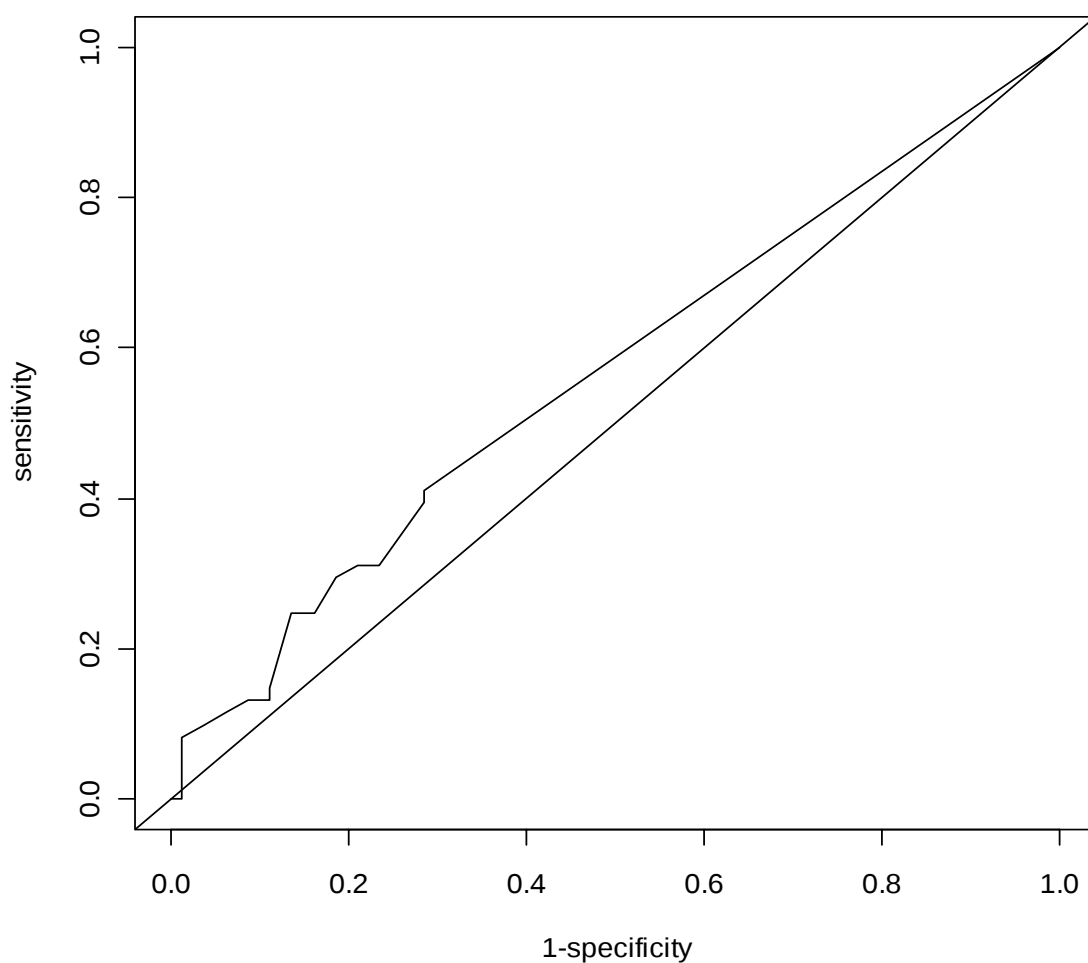
Para a comparação entre os marcadores e o desenvolvimento ou não de metástases a tabela seguinte foi construída, mostrando que não houve valores entre os dois grupos estatisticamente significantes.

Tabela 17 - Comparação do desenvolvimento de metástases ou não, comparado com a positividade ou a negatividade dos marcadores.

Marcador	categoria	Metástase		Total	p
		não	sim		
AKT	negativo	92 (75)	70 (80)	162	0.42
	positivo	31 (25)	18 (20)	49	
AKT fosfo	negativo	84 (75)	54 (68)	138	0.31
	positivo	28 (25)	25 (32)	53	
PI3K	negativo	105 (88)	75 (90)	180	0.53
	positivo	15 (13)	8 (10)	23	
PTEN	negativo	94 (81)	72 (88)	166	0.20
	positivo	22 (19)	10 (12)	32	

Por falta de algum marcador com significância, não consideramos necessário continuar com o cruzamento de valores de marcadores.

Não foram observados nem aumento em números de cópias nem deleções totais. As deleções encontradas foram definidas por um sinal vermelho (de PTEN) só por célula.



Legenda: A área sob a curva é de 56,6%.

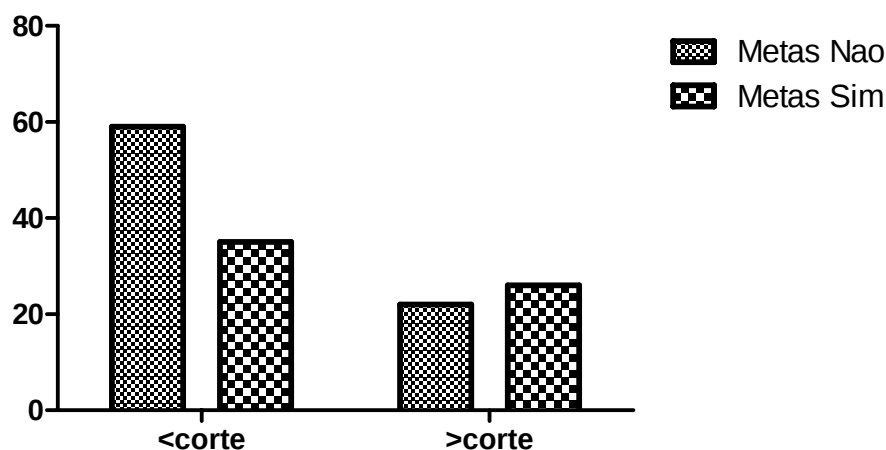
A ponte de corte para a porcentagem de deleções é de 40,68%.

A sensibilidade do teste de PTEN por FISH é de 40,98%.

A especificidade do teste é de 71,61%. Os mesmos valores foram obtidos, utilizando o programa de "Medcalc" para calcular as curvas de ROC por PTEN.

Figura 9 - Curva de ROC para os resultados de PTEN por FISH

PTEN (FISH) Metástases vs Sem metástases



Ponte de corte derivado pelo curva de ROC

P=0,0728
Risco Relativo= 1,369 (IC95=0,9701-1,933)
PPV=0,6277
NPV=0,5417

Figura 10 – PTEN (FISH) com metástases, comparado ao sem metástases, utilizando a ponto de corte de curva de ROC de 0,41.

4.1.3 Sobrevida

Os cálculos para a sobrevida foram feitos para a sobrevida câncer específica (SCE) e a sobrevida livre de doença (SLD). Nesta situação, as datas de “óbito por câncer” que foram anotadas nos prontuários foram consideradas para os gráficos de SCE. Houve poucos casos que foram censurados devido à outra causa da morte. Para calcular o tempo de sobrevida livre de doença, foram utilizadas as datas de diagnóstico de metástases de melanoma de coróide. Para ambos os cálculos utilizou-se a data de tratamento inicial, seja data de enucleação primária ou braquiterapia.

Todos os casos tinham um seguimento de cinco anos no mínimo, e muitos tinham um seguimento maior. Nem todos continuaram sendo tratados no hospital. Por

isto, vários gráficos e tabelas refletem a sobrevida por cinco anos, enquanto outros mostram o seguimento atual.

Tabela 18 - SCE em cinco (5) anos e RR para o seguimento total.

Variável	categoria	n	SCE (5 anos)	RR	IC(95%)		p
Gênero	masculino	138	0.77	1	-		0.54
	feminino	147	0.70	1.15	0.74	1.77	
Tratamento	Braquiterapia +Enucleação	70	0.75	1	-		0.95
	Enucleação	215	0.72	1.02	0.63	1.65	
Histologia	fusiforme	84	0.82	1	-		<0.0001
	epitelióide	61	0.61	2.73	1.48	5.04	
	mista	120	0.68	2.18	1.22	3.87	
Volume (COMS)	pequeno	13	0.79	1			0.43
	médio	83	0.75	1.89	0.45	7.99	
	grande	156	0.69	2.26	0.55	9.29	
Volume (Gass)	<= mediana	126	0.74	1	-		0.15
	> mediana	126	0.69	1.38	0.88	2.16	
Metástase	não	177	1.00	1	-		<<0.0001
	sim	108	0.39	2E+09	0	∞	

Os dados de SLD em 5 anos e RR (tempo de seguimento total) nas características do TUMOR (dados clínicos) estão colocados na Tabela que segue.

Tabela 19 - SLD em 5 anos e RR (tempo de seguimento total) nas características do TUMOR (dados clínicos)

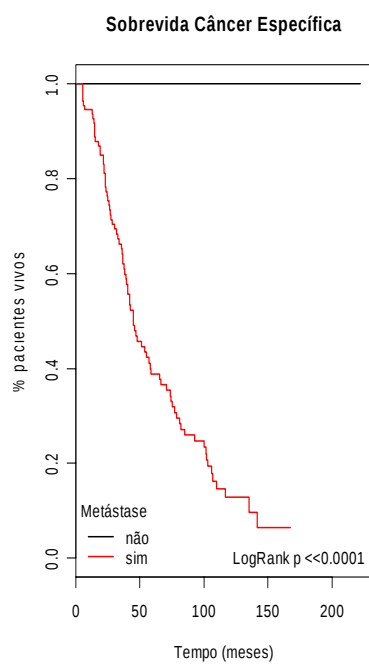
Variável	categoria	n	SLD	RR	IC(95%)		p
Gênero	masculino	138	0.65	1	-		0.22
	feminino	146	0.54	1.27	0.87	1.86	
Tratamento	Braquiterapia+	70	0.66	1	-		0.18
	Enucleação						
	Enucleação	214	0.57	1.36	0.87	2.12	
Histologia	fusiforme	84	0.71	1	-		0.02
	epitelióide	60	0.51	2.04	1.19	3.51	
	mista	120	0.51	1.88	1.15	3.09	
Volume (COMS)	pequeno	13	0.81	1	-		0.22
	médio	82	0.60	2.69	0.65	11.25	
	grande	156	0.54	3.13	0.77	12.78	
Volume (Gass)	<= mediana	125	0.65	1	-		0.02
	> mediana	126	0.51	1.58	1.06	2.37	

Tabela 20 - Sobrevida CE em 5 anos e RR para o seguimento total para os marcadores.

Marcador	categoria	n	SCE (5 anos)	RR	IC(95%)		p
AKT	positivo	49	0.78	1	-		0.22
	negativo	162	0.68	1.44	0.80	2.59	
AKTfosfo	positivo	53	0.75	1	-		0.84
	negativo	138	0.70	1.06	0.60	1.89	
PI3K	positivo	23	0.81	1	-		0.87
	negativo	180	0.70	0.94	0.43	2.06	
PTEN	positivo	32	0.77	1	-		0.37
	negativo	166	0.70	1.40	0.67	2.94	

Tabela 21 - Sobrevida LD em 5 anos e RR para o seguimento total para os marcadores.

Marcador	categoria	n	SLD	RR	IC(95%)		p
AKT	positivo	49	0.67	1	-		0.15
	negativo	162	0.50	1.46	0.87	2.45	
AKTfosfo	negativo	138	0.59	1	-		0.5
	positivo	53	0.47	1.18	0.73	1.89	
mTOR	positivo	64	0.59	1	-		0.23
	negativo	146	0.53	1.35	0.82	2.21	
PI3K	positivo	23	0.56	1	-		0.82
	negativo	180	0.55	1.09	0.52	2.25	
PTEN	positivo	32	0.63	1	-		0.19
	negativo	166	0.53	1.55	0.80	3.01	

**Figura 11** - Figura de Sobrevida câncer específica total em meses.

O tempo mediano de sobrevida câncer específico, ou seja, o tempo que demorou até que 50% morresse por câncer de coróide foi de quase 45 meses. (44.61m). O tempo médio de seguimento foi de 84,7 meses.

- **Modelo Múltiplo**

Todos os fatores com significância foram incluídos para a análise por modelo múltiplo. Porém, únicos fatores que ficam com significância no modelo múltiplo foram o tipo de célula predominante no tumor: a negatividade de PTEN chegou perto de significância.

- **Sobrevida Câncer Específica**

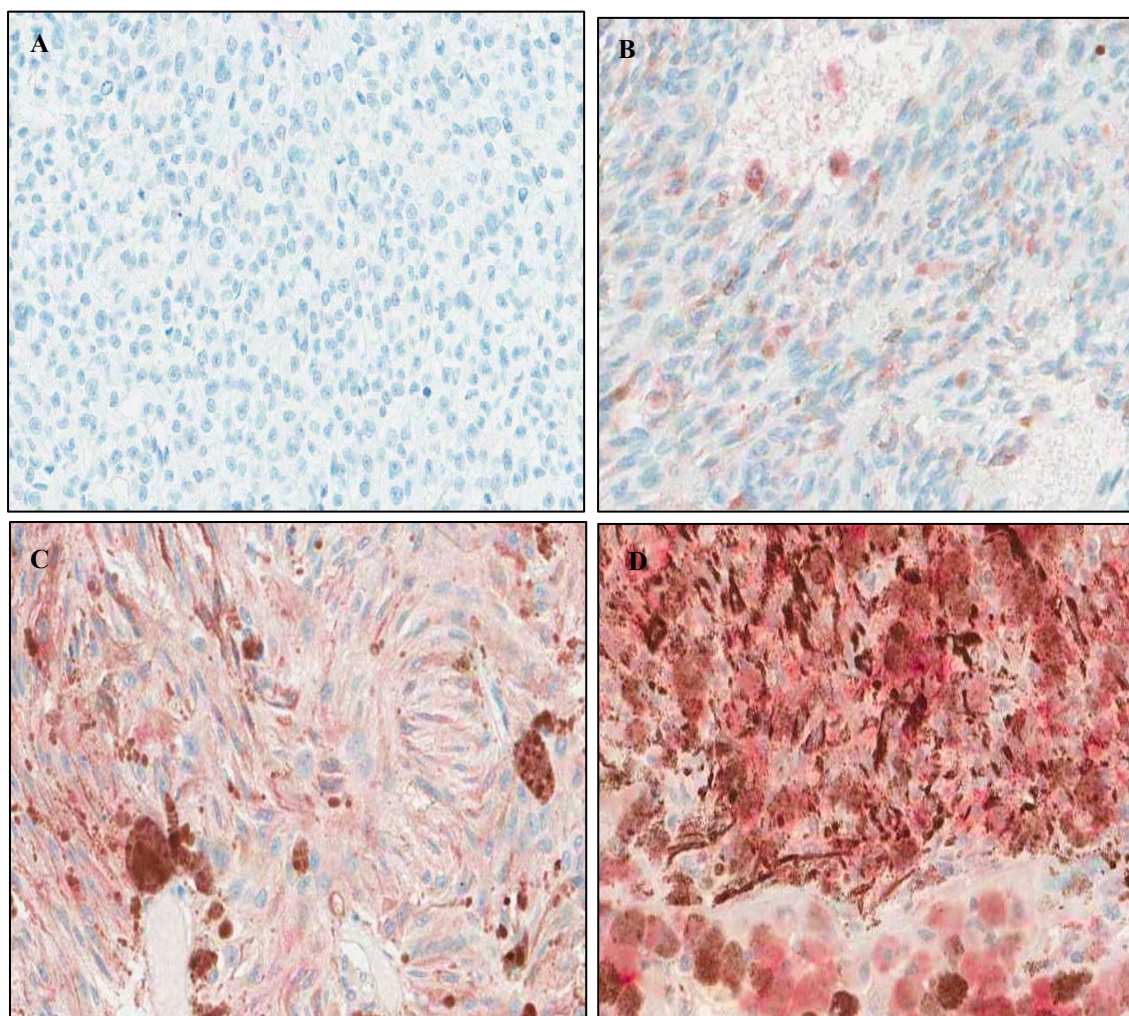
Tabela 22 - Tabela, mostrando as variáveis de histologia que ficam com significância no modelo múltiplo para a sobrevida câncer específico (SCE em cinco anos).

Variável		RRM	IC(95%)		p
Histologia		1	-		
	fusiforme	3.51	1.52	8.12	0.0033
	epitelióide	2.18	0.99	4.82	0.0543
PTEN	misto				
		1	-		
	positivo	2.47	0.88	6.96	0.0867
	negativo				

- **Sobrevida Livre de Doença**

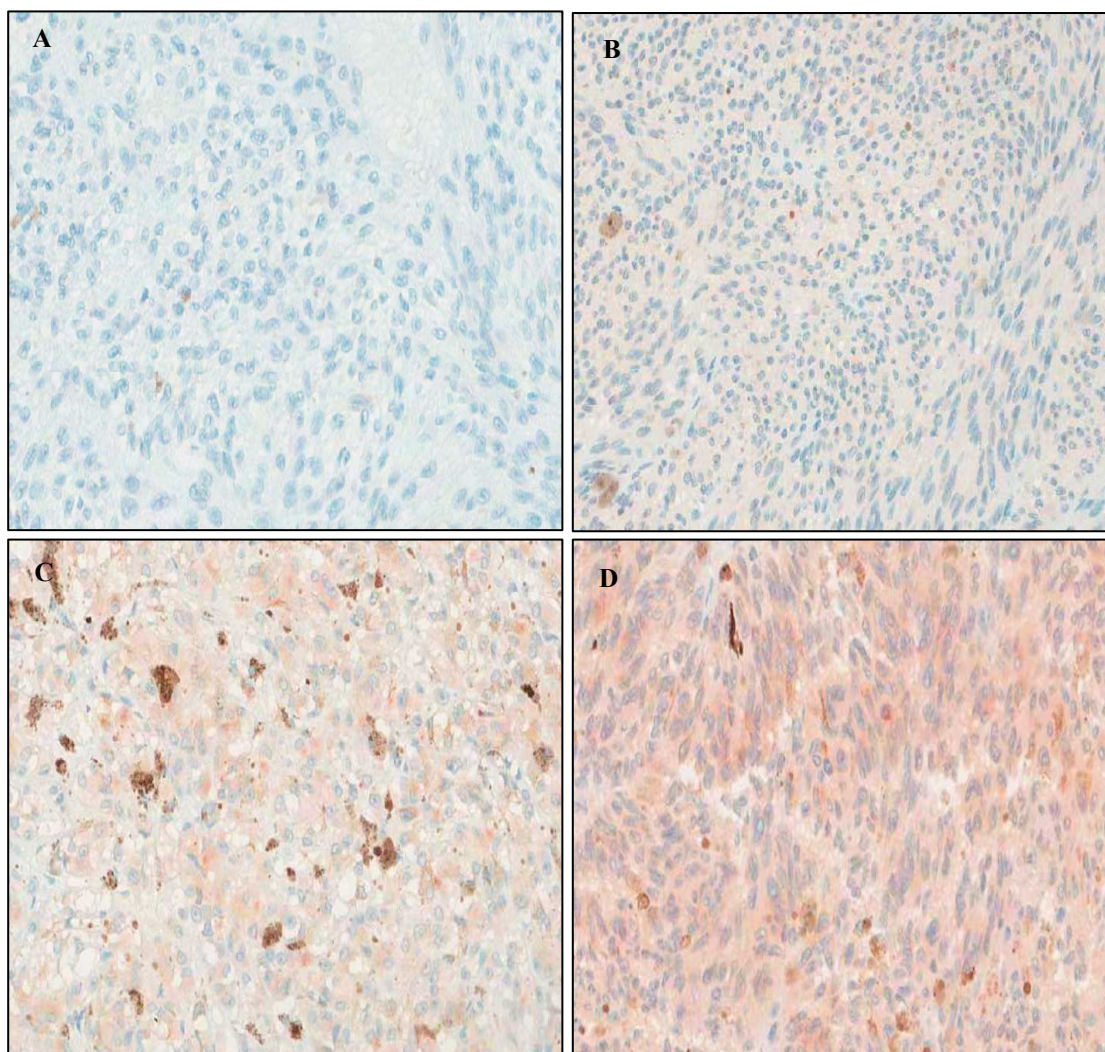
Tabela 23 – As variáveis significativas no modelo múltiplo para a sobrevida livre de doença (SLD)

Variável		RRM	IC(95%)		p
Histologia					
	fusiforme	1	-		
	epitelióide	2.58	1.21	5.50	0.0142
	misto	2.10	1.03	4.27	0.0403
PTEN					
	positivo	1	-		
	negativo	1.88	0.80	4.42	0.1457



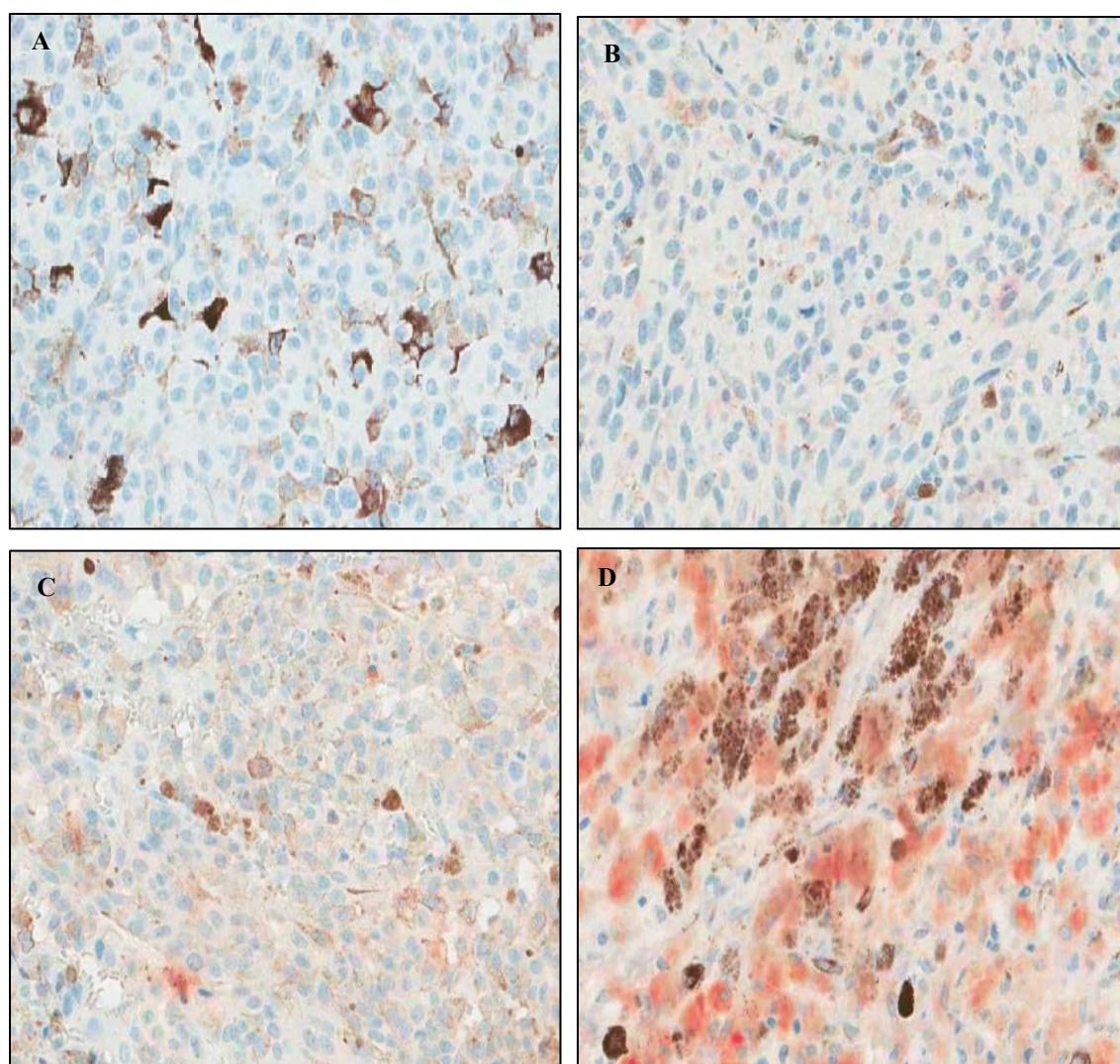
Legenda: A-negativo; B-Fraco; C-Moderado; D-Forte; X200

Figura 12 – Intensidade de marcação de PTEN



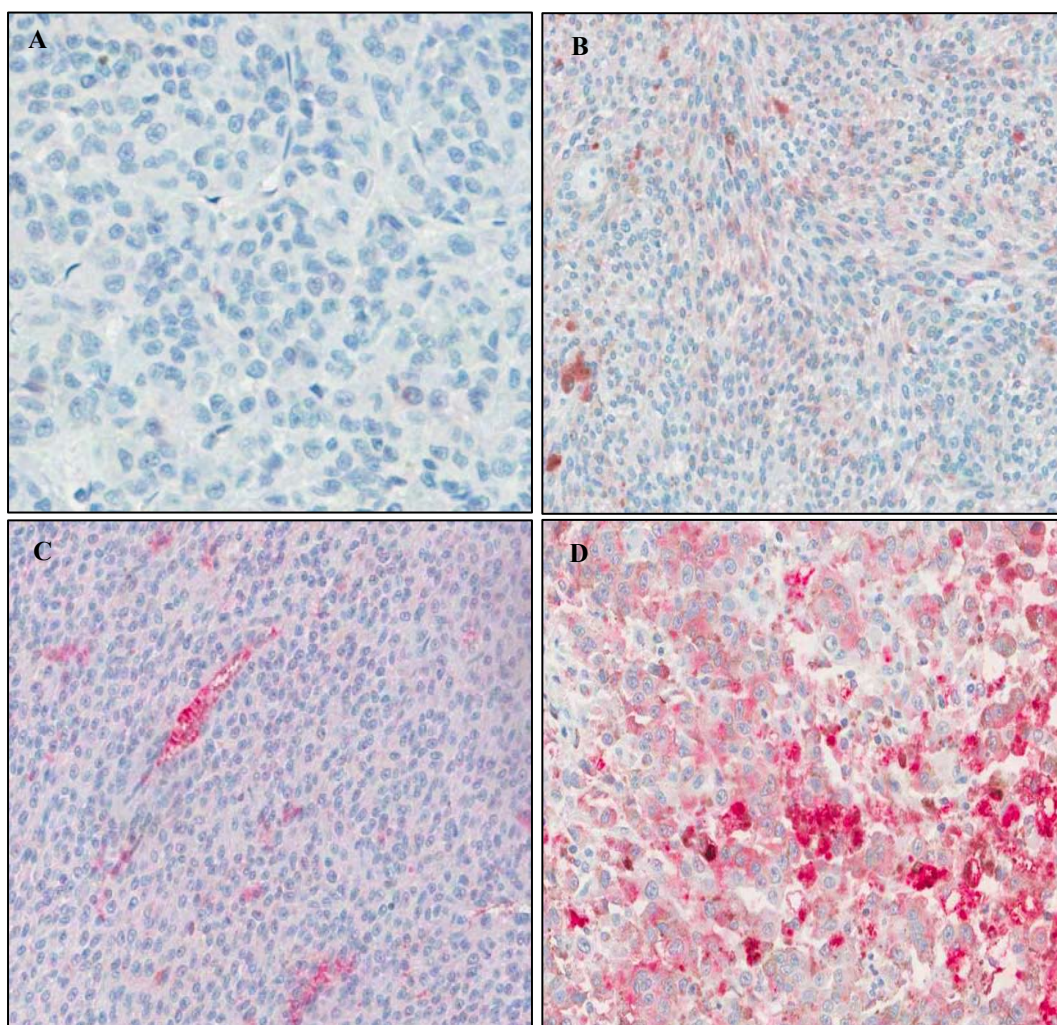
Legenda: A-negativo; B-Fraco; C-Moderado; D-Forte; X200

Figura 13 – Intensidade de marcação de PI3K



Legenda: A-negativo; B-Fraco; C-Moderado; D-Forte; X200

Figura 14 – Intensidade de marcação de AKT



Legenda: A-negativo; B-Fraco; C-Moderado; D-Forte; X200

Figura 15 – Intensidade de marcação de FOS-AKT

5 DISCUSSÃO

5.1 PARTE CLÍNICA

5.1.1 Idade e Genero

Este estudo retrospectivo representa o primeiro estudo feito no Brasil com dados epidemiológicos sobre melanomas malignos de coróide. Houve um total de 285 pacientes com enucleações feitos no HACC com dados suficientes a serem incluídos, durante o período do estudo, de 1988-2005 inclusive. Deste grupo, houve um total de 147 mulheres versus 138 homens ou uma razão de 52% de mulheres. A idade média de cada grupo foi bem semelhante, sendo 54 anos para mulheres v 53 para os homens neste estudo. (Tabelas 2 e 3: Idade e Gênero)

Outros estudos acharam uma idade no mesmo feixe etário. Um estudo da Finlândia (KUJALA et al. 2003) com 289 pacientes, todos tratados no *Helsinki Central Hospital, Dept of Ophthalmology*, de 1962 até 1981, mostrou uma idade média de 57 anos (13-97) anos com uma proporção de mulheres de 53%, que foram concordes com os dados apresentados deste hospital.

GRAELL et al. (2007) avaliaram um total de 303 pacientes, tratados em Barcelona, Espanha entre os anos 1984-2005, e observaram uma idade média de 60,09 anos, com 44,2% de homens e 55,8% mulheres.

Em um estudo da Dinamarca (ISAGER et al. 2005) mostraram uma incidência entre homens e mulheres quase igual sendo 145 casos de mulheres e 146 de homens no período de 1955- 2000.

O estudo de SINGH e TOPHAM (2003), usando os dados derivados de *SEER* nos EUA, mostrou uma incidência maior para os homens de 4,9, comparado aos 3,7 casos por milhão de população. O mesmo estudo observou a maioria dos casos em população “branca” (97,8%). Numa atualização dos dados de *SEER* feita até 2008, (SINGH et al. (2011) mostraram que os homens ficam mais afetados do que as mulheres ao menos nos EUA, sendo 51,8% versus 48,2% para as mulheres, dando uma incidência ajustada pela idade de 5,8 comparando com 4,4 para as mulheres. A idade média destes pacientes foi de 60,4 anos (59,4 anos para os homens e 61,5 anos para as mulheres).

Oriente Média: Arábia Saudita.

Um estudo do Arábia Saudita, durante os anos 1983-2005, com uma amostra de 60 pacientes com MMC tratados no “*King Khaled Eye Specialist Hospital (KKESH)*” um centro de referência na AS. Deste número, 40 preencheram os critérios para inclusão de COMS, sendo 24 homens e 16 mulheres. O autor destacou o fato que no mesmo período, o *KKESH* diagnosticou e tratou 567 novos casos de retinoblastoma. Ele observou que estes números sugerem uma incidência muito mais baixa para esta população árabe de perto de 27 milhões de pessoas (70% vieram de AS e os outros de países árabes vizinhos).

Em 1981 foi publicado o único artigo na literatura sobre a incidência na África de Sul (MILLER et al 1981). Observaram somente um caso de MMC (total de oito casos, três orbitários com sítio primário desconhecido e quatro casos de melanoma conjuntival) na província de Transvaal, em 25 anos. Esta paciente tinha 49 anos, apresentado uma história de perda de visão e dor; foi tratada como um caso de uveíte, com resolução de sintomas. Na sua volta três anos depois, tinha uma massa na órbita e uma exenteração revelou um tumor tipo epitelióide. Os autores relataram que os MMC nas raças africanas são extremamente raros;

Os autores destacaram o fato que havia 153 casos de MMC em pacientes categorizados como brancos, derivados de uma população de oito milhões de pessoas, na época.

Um estudo da Índia, BISWAS et al. (2004), observou um total de 103 pacientes com melanoma de coróide e uma incidência de 0,02% dos casos tratados um grande centro de referência para os olhos, em doze anos. A idade média destes pacientes foi de 45,7 (+/- 14,2) anos e 50% tinham menos de 45 anos. A maioria foram homens (61,2%).

LEE et al. (2011) estudaram 33 pacientes enucleados por MMC entre 1994-2009 na Coreia, e relataram que houve mais homens afetados (52%) com uma idade média de 53,2 anos. Em 1996 SAKAMOTO et al. publicaram um série de 16 olhos estudados histologicamente de MMC de Japão. A idade média foi de 55,2 anos e os tumores tinham um diâmetro basal de 11,36 mm em média.

O único artigo vindo da China neste período (KUO et al. 1982) mostrou uma casuística de 103 MMC enucleados de 1955-1979 em um centro de referência ocular no *Shanghai*, enquanto na mesma época tinham 631 casos de retinoblastoma (o tumor ocular mais comum em crianças). Estas estatísticas mostraram 688 casos de MMC e 110 casos de retinoblastoma diagnosticados no estado de Nova Iorque de 1975-86. Este fato destaca mais uma vez a suspeita que as populações do mundo não têm a mesma incidência de MMC; porém não existem muitos estudos para determinar isto com mais precisão.

Em suma, os dados sugerem que a idade média de apresentação de MMC no Brasil é cinco anos menor comparado à idade de apresentação na Europa e aos EUA, e aproximadamente 5-10 anos mais tarde do que os casos de Índia, e China. Parece improvável que a expectativa de anos de vida entre com um fator aqui; o Japão tem uma expectativa de vida, de 82,25 anos, e a Arábia Saudita de 76,3, comparando com 71,99

para pessoas do Brasil e 69,89 para a Índia, de acordo com as estatísticas compiladas pelo *CIAWorld Factbook (2011 estimates)*

5.1.2 Idade, Incidência e Metástases

Na tabela número quatro são apresentados os resultados de idade versus a presença ou ausência de metástases, no estudo de HACC. Neste estudo houve uma diferença entre a idade de diagnóstico de pessoas que nunca desenvolveram as metástases (52,0 anos) comparados àqueles que as tiveram (55,6 anos). Esta diferença ficou sem significância estatística com um $P=0,05$ enquanto o P foi significativo somente com $P<0,05$. O COMS (2006) mostrou que somente uma idade acima de 60 anos no diagnóstico e um diâmetro basal maior do que 11 mm foram fatores preditivos para o tempo para a morte.

Outro estudo de COMS (2001) de tumores grandes tratados com enucleação ou irradiação feixe externa antes de enucleação, mostrou que 64% dos pacientes tinham metástases em menos de seis anos depois de diagnóstico de tumor primário, e deles, o tempo mediano de sobrevida depois de diagnóstico de metástases foi de seis meses.

Um estudo recente de Espanha (PONS et al. 2011) mostrou uma idade mediana de 61 anos na ocorrência de metástases, com um intervalo de 25,63 meses (0,17-102,43 meses) dos 58 pacientes consecutivos de um período de quase 20 anos, seguindo o mesmo tipo de tratamento e seguimento na mesma instituição. Estes pacientes tinham uma sobrevida média de 10,83 meses, e o tratamento com um programa de quimioterapia ou somente o *Best Supportive Care* (cuidados de suporte) não fez diferença entre os grupos. Na análise multivariada, um estado de ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group performance status) de 1-2 foi associado com um risco de 2,40 e o número de metástases no fígado com um risco de 5,65 de pior sobrevida.

É muito difícil formar uma opinião sobre as incidências relativa desta doença em países fora da Europa e os EUA, onde os registros de câncer foram iniciados e continuam sendo atualizados. Aqui no Brasil, não houve dados sobre o número de casos de MMC diagnosticados no país, e por isto, é impossível acertar se nossos pacientes seguem algum padrão ou outro publicado na literatura.

Por falta de dados sobre a incidência de MMC aqui no Brasil, os comentários serão relacionados às incidências publicadas para outros países.

Outros estudos de Europa Norte usavam os dados de países aderentes ao EUROCARE. Este grupo se compõe de 67 registros de 22 países da Europa com uma população de 100 milhões. Durante o período de 1983-94, nesta database houve 5566 casos de MMC recordados, dos quais quase 80% foram localizados na coróide, descritos em de 33 registros de 16 países.

Este estudo mostrou uma incidência de dois casos para a Espanha e o sul da Itália, enquanto um aumento de quatro até cinco casos para os países da França, Holanda, Sueca e Alemanha. Houve uma distribuição nas incidências dependendo da latitude e longitude; uma incidência de seis por milhão nos países de leste. Os países Nórdicos tinham as incidências mais altas, sendo de 6,1 para Finlândia, e 6,3 de Islândia, 7,1 para Suécia, 8,4 por Noruega e o máximo recordado de 8,6 casos na Dinamarca.

A influência de latitude e a exposição ao sol estão sendo discutidas frequentemente na literatura. Porém, os autores (EUROCARE) comentaram que estas incidências seguem uma linha de sul para o norte, que varia com a latitude. Não se pode determinar a correlação entre a latitude e o aumento na exposição à luz de UV, ou se esta variação em incidências se relaciona com a tendência das populações de desenvolver mais pigmento na pele em resposta ao sol. Sabe-se que as populações no

sul da Europa, em geral, vêm de uma população com mais pigmentação da pele do que muitos membros das populações dos países com uma latitude maior. Neste caso de MMC, parece que há mais casos em países com latitudes maiores. ($P=0,008$). Esta tendência não é seguida pelos melanomas da pele, em que a incidência é maior com menos latitude, Segundo Seddon et al. (1990), citado por VIRGILI et al. (2007, p.2314) No caso de MMC, VIRGILI et al. (2007) sugerem que a explicação levada pelo Sedden et al. como a mais provável, mostraram um risco relativo de 6,5 para o desenvolvimento de MMC com antepassados de origem da Europa do norte. VIRGILI et al. (2007) acharam que uma sensibilidade genética combinada a quantidade de pigmentação ocular e de pele são os mais importantes determinantes

No caso deste estudo, é difícil saber onde o Brasil se encaixa nesta pergunta sobre o sol. O Brasil tem uma extensão de latitude de quase 39 graus; 5,2 graus norte do equador e até 33,7 graus sul (*wiki answers.com*). O mesmo *site* informou que a extensão da Europa é aproximadamente 36 graus até 71 graus norte. Com estas medidas, o Brasil fica muito mais perto do equador do que quase toda a Europa. Pelo raciocínio, seguindo os dados da Europa, isto poderia indicar que no Brasil tem uma incidência mais próxima da Espanha que registrou uma incidência de aproximadamente dois casos por milhão de população.

O HACC recebeu muitos casos de MMC no período estudado. Outras instituições receberam pacientes com MMC e é provável que, muitos destes tumores foram enucleados nestas instituições. Em sua formação média, os oftalmologistas foram preparados para diagnosticar um MMC e como enucleá-lo. De outro lado, também, seria possível que estes MMC não serão reportados para o INCA.

5.1.3 Raça

A raça branca é predominante em muitos estudos provenientes da Europa e EUA.

A COMS (1998a); relatou que nos EUA, uma incidência de 97% de pessoas brancas (não-hispânicas). SINGH et al. (2011), usando dados de SEER, encontraram uma porcentagem de 97,8% de pessoas brancas, com uma incidência na população negra de 0,5%, enquanto 1,7% casos foram classificados de “ outros”. De um total de 2586 pacientes tratados em um dos maiores hospitais de olhos nos EUA, O “Wills Eye Hospital ‘em Philadelphia, Penn, EUA, durante o período de 1974-1987 registrou 10 pacientes negros, em mais de 3000 casos. No *Armed Forces Institute of Pathology*, um centro de referência dos EUA para todas as doenças, o número de casos MMC em pessoas negras foi de 24 (PHILLPOTTS et al.1995).

MARGO et al. (1998), utilizando os dados disponíveis do *Florida State Cancer Registry* observaram uma incidência de MMC de 7,2 (homens) e 6,6 (mulheres) (total 6,9) casos por milhão de população branca e não-hispânica. Os valores caíram para 2,6 (homens) e 2,4 (mulheres) (Total=2,5) por milhão de população branca de origem Hispânica. Para pessoas designadas como Negros e Não Hispânicos, as incidências foram as mais baixas, sendo 0,1 para os homens e 0,3 para as mulheres (total 0,2).

Os autores atribuíram estas diferenças ao grau de pigmentação de pele, sendo que muitas pessoas de origem Hispânica têm mais pigmentação do que as pessoas brancas.

Um dos estudos utilizando os dados de *SEER* nos EUA (HU et al. 2005) concluiu que as incidências de MMC não são iguais para todos os grupos étnicos. Eles calcularam, utilizando uma amostra de 1352 casos, que a incidência ajustada pela idade de MMC nos EUA, por milhão de população por ano, foi de 0,31 de pessoas negras,

0,38 para as asiáticas, 1,67 para as hispânicas, e 6,02 para as brancas não hispânicas. Estes resultados deram um risco relativo de 1,2 para as asiáticas e moradores das ilhas pacíficas, 5,4 para as hispânicas e 19,2 para as pessoas não hispânicas brancas, comparados ao risco para pessoas negras. Ao comparar os casos hispânicos com os brancos houve um risco relativo de 18,2, comparado aos casos negros.

Em nosso estudo, 92% da amostra foi classificada no prontuário como branco, 6% como pardo e 1% de asiático e negro. Esta estimativa indica que a população de pacientes portadores de MMC no Brasil aproximou-se mais perto das incidências dos dados de brancos de EUA ou a Europa do norte.

Contudo, nas últimas décadas, o conceito de estratificação de populações devido às características genéticas está sendo muito discutido.

No Brasil vários estudos foram realizados nos últimos dez anos sobre a composição genética de nossa população, estudando a distribuição de modificações alélicas nas populações para determinar corretamente as origens da nossa população.

Estes estudos são extremamente importantes porque têm implicações clínicas. Alguns exames diagnósticos como o teste para a Fibrose Cística demonstraram não ser tão exato fora da Europa do norte. Observa-se a mutação de F508del presente com uma frequência de 80% em alguns países do oeste Europeu. Esta mutação tem uma frequência no Brasil de 48%; na Argentina 59% e na população de Costa Rica a frequência está menor ainda, sendo 23% (PERONE et al. 2010). Uma publicação de 2010 da Índia (PRASAD et al. 2010) mostrou uma frequência de F508del na amostra de 100 casos de 24%. Neste mesmo estudo, numa amostra de 21 casos, 13 foram conhecidos e oito mutações foram novas (que representaram 15% do total dos alelos estudados). Estes estudos mostram que os “kits” comerciais desenvolvidos para o diagnóstico desta doença não vai ser aplicável para todos. Uma proporção significativa s

não foi diagnosticada desta maneira. Nem sempre o diagnóstico está correto e nem sempre o tratamento adotado é o mais eficaz.

Esta variação em respostas clínicas poderia ter uma base relacionada não só aos fatores ambientais, mas também por composição genética. Embora a maioria dos pacientes sejam registrados como “brancos” discute-se na literatura genética como uma pessoa é classificada de branca.

No Brasil, houve três grupos específicos derivados por imigração em tempos diferentes. Os ameríndios foram o primeiro grupo a ser conhecido, com uma população estimada em 2,5 milhões de pessoas em 1500, na chegada dos Portugueses. Houve um período de casamentos e integração dos portugueses por volta de 1808, e as regras de imigração foram relaxadas. 50 anos depois da chegada dos portugueses, um número grande de africanos começou a emigrar para trabalhar como escravos nas fazendas de açúcar, de café e nas minas de ouro. Milhões de africanos chegaram ao Brasil de 1550 até 1850, quando a escravidão foi formalmente abolida. A escravidão não terminou verdadeiramente; pois os fazendeiros do sul do país compraram os escravos do norte, aproveitando a crise econômica. O crescimento das fazendas de café exigiu mais trabalhadores e a imigração recomeçou mais uma vez, com os portugueses e depois dos anos 1930, os japoneses. Depois dos anos de 1872, o Brasil recebeu mais 5,5 milhões de pessoas principalmente vindos da Europa. A composição deste grupo foi calculada assim: 34% de Italianos, 29% de portugueses, 14% de espanhóis, 5% japoneses, 4% alemães 2 % de Líbano e Síria, e 12 % de outros lugares (PENA et al. 2010).

O *homo sapiens* originou-se na África, e muitos africanos saíram em massa para outros continentes.

O jornal *Science* em setembro e em outubro deste ano publicou dois artigos, sugerindo que o *H sapiens* se misturou com um ou mais grupos de pessoas humanas

agora extintas na África, e os *Neandertals*, possivelmente no oeste de Ásia e com outro grupo chamado *Denisovans* do Ásia Central. Estas novas pesquisas fazem uma mudança de paradigmas no pensamento científico sobre as origens humanas (GIBBONS 2011).

É importante estudar geneticamente as populações em geral; porque as quantidades de *admixture* ou miscigenação mudaram as histórias naturais de doenças e a resposta de tratamentos. Isto já está sendo considerado para os polimorfismos de CYP2C19 quanto aos riscos dos eventos adversos com tratamento de pacientes Brasileiros com uma droga anti-plaqueta chamado *clopidogrel* (SANTOS et al. 2011). Além disso, sabe-se que a dosagem de *warfarin* depende de qual polimorfismo o paciente tem do alelo VKORC1 (LIMDI et al. 2010).

LINS et al. (2011) publicaram um estudo mostrando que o método de determinação de raça por si mesmo não é concorde com os resultados de genotipagem por marcadores. Este grupo observou que a amplitude e variância obtida no nível individual de resposta, nem sempre pode ser considerada correta. Os autores observam um grau alto de *admixture*, ou miscigenação, indicando que duas pessoas com o mesmo grau de *admixture* (mistura genética dos marcadores ancestrais) poderiam incluir em qualquer categoria étnica. O acontecimento disto por acaso seria de 14%. Mais interessante ainda, o grupo negro tinha mais de 53% de marcadores da origem não africana.

Outros estudos feitos no Brasil observaram um alto índice de mistura genética. Alguns deles concluíram que a definição de etnia não deve ser baseada nas opiniões das pessoas para estudos científicos (LINS et al. 2010).

Voltando para o estudo de MMC e raças reportadas indicam que a nossa amostra foi composta de 92% brancas, 6% pardas e 1% negras e asiáticas. Esta amostra veio de

todo Brasil para ser tratado, no HACC, o único centro de referência de SUS para tratamento desta doença, na época. Este fato poderia ter uma razão muito importante para explicar, porque os dados em termos de idade ao diagnóstico, tempo para desenvolver as metástases entre outros, parecem diferentes daqueles dos países da Europa do Norte (como Finlândia, Sueca Dinamarca, Arábia Saudita, Índia, Japão) onde a miscigenação genética é diferente.

Em suma, a população brasileira caracteriza-se pela miscigenação de raças. Esta miscigenação pode ter reflexos na genética, pois esta mistura de genes pode levar à uma predisposição aumentada para o desenvolvimento do câncer.

5.1.4 Intervalo entre a queixa e o diagnóstico

Neste estudo (Tabelas 6, 7 e 12) o intervalo médio em meses entre o diagnóstico e o diagnóstico de MMC foi de 10,7 meses para os homens versus 8,5 meses para as mulheres. Comparando o intervalo para pacientes que subsequentemente desenvolveram as metástases, os valores foram de 12,3 meses (sem) e 5,5 meses (com). Os homens demoraram mais para ser diagnosticados do que as mulheres, indicando que eles prestam menos atenção aos sintomas, e/ou tinham mais dificuldades para ir a uma consulta.

Apesar disto, pessoas que eventualmente desenvolveram doença metastática conseguiram um intervalo menor entre a queixa e o diagnóstico médio de 5,5 meses versus 12,3 para aqueles não metastáticos. O desvio padrão foi muito maior para o grupo sem metástases (36,4 meses versus 7,0 meses, corroborando com a literatura; os tumores maiores são vistos pelos oncologistas oculares mais rapidamente do que aqueles menores (DAMATO 2001). O volume dos tumores em pacientes que

desenvolveram as metástases foram maiores (1231 mm³ versus 856 mm³, P=0,03, Tabela 12) na casuística de HACC.

Estes valores indicam um tempo de espera maior do que foi reportado na Inglaterra (DAMATO 2001) que deu um tempo de 129 dias para os tumores pequenos, de 50 dias para os tumores de médio porte e de 34 dias para os tumores grandes. Na Finlândia, um estudo de ESKELIN e KIVELÄ (2002) mostrou uma demora de 57 dias em média do tempo de apresentação inicial seja com um optometrista, um médico não oftalmologista ou oftalmologista. Este artigo não deu informes sobre o intervalo de início dos sintomas e o diagnóstico definitivo em que o tratamento foi proposto (*treatment planning*). Com este intervalo, os tumores que foram tratados ali foram menores em tamanho, tendo em média uma altura de seis mm, com um diâmetro basal maior de 11 mm, comparado com as medidas correspondentes daqui de 9,13 mm e 13,81 mm.

Depois de 2000, na Inglaterra, o ideal foi que todos os pacientes que tinham uma consulta com o seu clínico geral (*General Practitioner*) precisariam ter uma consulta com a oftalmologia em 14 dias. Atualmente, na Inglaterra, o diagnóstico e o tratamento deve acontecer em 31 dias (*NHS Cancer Services 2011*).

No Brasil, não temos este protocolo.

5.1.5 Tipo de Tratamento recebido Primariamente

215 pacientes foram submetidos ao tratamento de enucleação primário (75%) com 70 (25 %) que receberam a braquiterapia com placa radioativa antes de enucleação secundária (Tabelas 8 e 9). Sabe-se que houve uma proporção de tumores que continuam crescendo depois do tratamento com braquiterapia.

Na literatura, em um estudo da Suécia, com 266 pacientes tratados com placas de rutênio 103, houve uma falha de tratamento (definido como enucleação depois da placa) em 46 pacientes (17%). Na análise multivariada, os autores não acharam nenhuma variável preditiva (SEREGARD et al. 1997). Esta falta de variáveis preditivas foi observada por LOMMATZSCH et al. (2000) em uma série de 141 pacientes com seguimento de 15 anos ou mais. Dentro deste grupo, 31,2% dos olhos foram submetidos a uma enucleação secundária. A maioria das falhas do tratamento aconteceu em menos de três anos do tratamento com braquiterapia (24/44=55%): houve dois pacientes com recorrência, necessitando uma enucleação após de 20 anos de tratamento. Esta tendência de recorrência depois de muito tempo foi confirmada no uso de placas de Iodo 125 pelo grupo de UCSF (CHAR et al. 2002). Considerando a sobrevida, não houve uma diferença entre os casos enucleados e os não enucleados ($P=0,937$).

No estudo de pacientes coreanos de LEE et al. (2011), um terceiro recebeu uma enucleação secundária por falha do tratamento primário: a sobrevida câncer específica foi de 78% aos 5 anos e caiu um pouco aos 10 anos para 70%.

O estudo de HACC deu resultados semelhantes; não houve diferenças em termos de desenvolvimento da incidência de metástases em ambos os grupos ($P=0,67$).

O COMS (2006) sobre um seguimento de 12 anos de pacientes com tumores de tamanho médio tratados com I-125, confirmou um estudo de 2005 em que não se registrou nenhuma diferença em sobrevida em cinco anos em pacientes tratados com placas de I-125 comparados aqueles que foram submetidos à enucleação. No grupo tratado com I-125 as incidências da morte por melanoma foram 10%, 18% e 21% as 5, 10 e 12 anos depois de tratamento. Pelo grupo tratado inicialmente com enucleação, as mesmas incidências foram 11%, 17% e 17%.

Na casuística do HACC, não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida câncer específica (SCE) em cinco anos entre o grupo que foi tratado com enucleação primário, comparado com o grupo tratado primeiramente com braquiterapia e depois com enucleação. A SCE calculada foi um pouco maior para o grupo com enucleação secundária, sendo 0,75 em contraste ao 0,72 para o grupo de enucleação primária. É preciso lembrar que os tumores normalmente são tratados com enucleação, porque são grandes demais para tratamento com braquiterapia. O risco relativo para o seguimento total foi de um para o grupo com braquiterapia primeiramente, e 1,02 para enucleação, primeiramente ($P=0,95$, Tabela 18).

JAMPOL et al. (2002) mostrou uma associação fraca do risco relativo ajustado ($1,5:P=0,08$) mas não significativo para o tratamento com braquiterapia e depois com enucleação.

5.1.6 Histologia

Nesta casuística total de HACC houve uma predominância na histologia (Tabela 10) de tumores tipo “misto”, definida como um tumor com números iguais de células epitelióides e fusiformes, observado em 120 dos 276 (43,6%) casos com dados histológicos vindo das laudas de Departamento de Anatomia Patológica. O segundo tipo mais frequente foi de Fusiforme com 30,4%, e o tipo epitelióide em terceiro lugar com 22%. Houve 11 casos (4%) de tumores desenhados como necróticos.

O tipo fusiforme foi mais comum em tumores que não se desenvolveram em metástases (73% VS 23%), enquanto houve uma preponderância de tipo misto em tumores sem metástases (58% VS 42%). O tipo epitelióide foi um pouco mais comum em tumores com metástases (52% VS 48%). A célula predominante foi uma determinante importante no desenvolvimento de metástases ($P=0,008$).

O tamanho de tumor não correlacionou com o tipo de célula (todos os valores de p foram acima de 0.05). Neste assunto, foram incluídos todos os tumores porque as medidas foram feitas antes de qualquer tratamento, não depois.

É fora do assunto desta tese falar sobre a progressão de tipo de célula no tumor. Não temos como saber se um tipo de célula evolui para outro tipo ou não. É preciso destacar que todas as amostras vieram de um sítio considerado como típico do tumor; utilizando este método tentamos acertar que os sítios selecionados foram representativos dos tumores.

O volume de tumores de tipo epiteliode, na enucleação, tinha o mesmo tamanho, seja tumores que desenvolveram doença metastática ou não.

O volume de tumores tipo fusiforme sem metástases tinha menos volume do que aqueles que desenvolveram metástases; porém, este valor não atingiu significância.

Os tumores mistos, ou seja que contem ambos os tipos de célula e mas ou menos proporções iguais, apesar de ter um média maior de volume para os tumores que desenvolveram com doença metastática, não mostraram uma significância significativa

Por isto, não é possível falar que os tumores com o tipo de célula já provada como associada com um prognóstico pior, como os tumores tipo epiteliode, tinham volumes maiores (por causa de crescimento mais rápido, por exemplo).

A nossa casuística difere daquelas observadas pelo COMS (AVERY et al. 2008) que mostrou uma incidência de 86% de tumores enucleados tipos mistos, epitelióides com 5%, e fusiforme com 9%. Este estudo tinha 1527 olhos enucleados, mas, não relacionou a sobrevida com a histologia.

O artigo de LEE et al. (2011) com pacientes coreanos mostrou que a histologia mais frequentemente associada com metástases foi de tipo epitelióide ($p=0,038$).

KUO et al. (1982) publicaram um artigo sobre o assunto de MMC na China, relatando as incidências sobre para os tipos de células predominantes. Em 65 casos, houve 16 casos de tumores fusiformes (24,6%) tipo epitelióide com 14 (21,5%), 28 casos de tipo misto (43,1%) e seis casos (9,1%) tipo necrótico. Os autores não tinham muitos dados de seguimento nestes casos; somente 12 casos foram vivos, e seis casos mortos em cinco anos. Os outros casos (46) não tinham dados disponíveis.

Ao contrário, o BISWAS et al. (2002) na Índia, observaram uma incidência de 72% de tumores tipo mistos (51/71 olhos, seguido pelo tipo fusiforme em 22% (16/71 casos) e o tipo epitelióide a 6% (quatro casos) foi menos comum. A idade média destes pacientes foi menor 46,1 anos; este valor foi mais perto de nosso valor de 53 anos para os homens e 54 anos em geral para as mulheres.

Um estudo do Japão em 1995 (SAKAMOTO et al. 1996) observou que a idade média para este tumor foi de 55 anos. O tipo mais comum foi o de células mistas 44% (7/20 casos); 38% (7/20) tipo fusiforme enquanto quatro casos foi de tipo epitelióide.

Na Arábia Saudita, ALSUHAIBANI (2009), a proporção foi diferente: houve 70,6% (24/34 olhos disponíveis) de tipo fusiforme, 17,6% com células de tipo misto e 11% tipo epitelióide.

No estudo de LEE et al. (2011) o tempo médio para a descoberta de metástases foi somente de 16 meses, e a sobrevida depois deste diagnóstico foi de 5 meses. A histologia associada com as metástases foi de tipo epitelióide ($p=0,038$). Este grupo fez alguns estudos cromossômicos, mostrando uma associação significativa com a morte por metástases e a monossomia 3 e polissomia de 8. Os autores concluíram que a sobrevida câncer específica por pacientes coreanos com MMC não foi pior do que para os pacientes da Europa, apesar dos resultados de SAKAMOTO et al. (1996) que mostraram uma mortalidade de 31% aos quatro anos na população japonesa estudada. A

taxa de mortalidade foi de 0 % para os fusiformes, superior a 43% para os tumores tipo mistos e 66% para os epitelióides.

5.1.7 Tamanho de Tumores

Na nossa casuística, os tumores MMC tinham em média uma largura de 13,81mm com um diâmetro transversal de 12,31 mm, e uma altura de 9,13mm (Tabela 11). De acordo com o esquema de COMS (MARGO 2004), um tumor de pequeno tamanho teria uma altura $< 3\text{mm}$ com uma base de 5 até 16 mm em diâmetro. Um médio teria que ter uma altura de $3,1\text{mm} \leq 8\text{ mm}$ com um diâmetro de até 16 mm, e um tumor de grandes proporções seria aqueles acima de 8 mm em altura, com uma base de $> 16\text{ mm}$. Em termos de altura temos uma média maior do que 8 mm, sendo 9,13 e uma mediana de 8,53mm, que deixariam os nossos tumores dentro de categoria maior. Os nossos diâmetros não atingem $> 16\text{ mm}$, sendo menor que as medidas de 13,81 (13,77mm) pelas médias e medianas, e com uma medida de 12,31 (média) e 12,06 mm (mediana) pelo diâmetro transversal e 13,81(média) com 13,77 mm para a mediana. Utilizando a altura como um ponto de corte, nossos tumores foram classificados no esquema de COMS como tumores grandes. O estudo de COMS (1998a) também classificou os pacientes com tumor perto de nervo ótico ($\leq 2\text{mm}$) com uma altura de $> 8\text{ mm}$, com um caso elegível para ou enucleação ou irradiação por feixe externa antes de enucleação (os dois braços deste estudo).

Por este estudo achamos relevante acertar as médias e medianas de diâmetro basal (longitudinal e transversal), e altura, separadamente. Isto não foi feito pelo estudo de COMS, dificultando comparações entre os nossos resultados e os deste estudo.

No COMS a altura média foi de 9,5mm associada com um diâmetro médio basal maior de 17,2 para um tumor seja considerado grande e ilegível para ser submetido à

irradiação do olho antes de remoção (COMS 1998a) Nem a média de altura nem de diâmetro basal maior em nossa casuística chegou nestas medidas.

5.1.8 Sobrevida Câncer específica e Sobrevida Livre de Doença

Fizemos um gráfico de sobrevida para os dados dos pacientes em nossa casuística, e descobrimos que este método de COMS para separar os grupos não mostrou uma sobrevida diferente dos três grupos. O grupo com tumores pequenos tinha uma sobrevida média de 2557 dias, o grupo de tamanho médio foi de 2547 dias e do tamanho maior foi um pouco menos aos 2345 dias. As diferenças não foram significativas ($P=0,1124$; Log Rank).

O tempo de seguimento médio do grupo de casos sem metástases foi de 257 dias (7,05 anos), enquanto o seguimento daqueles casos com tumores foi de 1289 dias (média) (3,52 anos). Quase todos os pacientes deste grupo morreram; pois, o seguimento representa o tempo até o óbito ($P=0,0023$ Gehan Brehan Wilcoxon).

Por este motivo, decidimos calcular os volumes, utilizando dois métodos diferentes; primeiramente com o método de Gass (SINGH et al. 2007) e segundo pelo método de RICHTIG et al. (2004).

No método de Richtig, a fórmula usada é: $(4/3\pi a^2 b) / 2$ para obter a volume de uma metade de um elipsóide rolado (*rotated ellipsoid*). Neste caso o valor de $a = (\text{diâmetro basal longitudinal} + \text{diâmetro basal transversal} / 2)$. A fórmula de Gass é mais simples ainda, sendo: $(\pi/6) D1 \times D2 \times H$. O valor de D1 aqui é o diâmetro longitudinal maior, enquanto D2 representa o diâmetro transversal em mm; e H o valor de altura em mm. Os volumes foram calculados com os dois métodos e houve semelhança estatística nos valores.

Utilizando o método Gass, o valor médio de volume dos tumores nesta casuística foi de $1003,18\text{mm}^3$, com um desvio padrão enorme de 1197,57. O mínimo foi 1,65 e o máximo foi de 15.079,63, dando uma mediana de $745,28\text{mm}^3$.

Em nosso estudo houve várias variáveis diferentes entre os pacientes com doença metastática e aqueles que não desenvolveram as metástases (Tabela 12). A idade foi importante sendo maior em pacientes com metástases ($P=0,05$). A largura, o diâmetro transversal, a altura, e o volume foram maiores em pacientes que desenvolveram as metástases (valores de P correspondentes: 0,001; 0,01; 0,04; e 0,03).

SHIELDS et al. (2009) publicaram um estudo relacionando a espessura do tumor ao diagnóstico com o desenvolvimento de metástases em uma série de 8033 pacientes com MMC. Eles concluíram que houve um aumento na incidência de metástases com cada milímetro de aumento de espessura de tumor. Utilizando o mesmo esquema do que o COMS, pela espessura dividido, em pequenos ($\leq 3\text{mm}$, médio $3,1-8\text{mm}$, grande $> 8\text{mm}$) os resultados para a probabilidade de ter metástases em 3,5 e 10 anos foram 2% 5,4% e 11,6%, para os tumores pequenos. Para os tumores de média porte os incidências foram estimadas em 7,2%, 13% e 25,4%, enquanto para os tumores grandes os valores correspondentes foram estimados em: 22,2%, 35,5% e 48,7%.

Em suma, os autores calcularam um aumento em risco de 1.06 por cada aumento de um mm, em espessura.

Vários estudos que falam sobre um aumento em incidência de mortalidade aos cinco anos com um aumento de tamanho, a serem discutidos futuramente com a sobrevida em cinco anos e risco relativo.

A casuística de HACC é semelhante (Tabelas 18 e 19), com um SCE em cinco anos de 77% para as mulheres e de 70% para os homens (a diferença não foi estatisticamente significativa).

SINGH et al. (2011) relataram que não houve aumento na sobrevida relativa de 5 anos, que ficou as 81,6%.

Um estudo do registro de câncer de Suécia mostrou uma incidência de sobrevida câncer específico pelo MMC de 70,1% em 5 anos, diminuindo um pouco até 59,4% depois de 10 anos (BERGAMAN et al. 2003). Um estudo de 32 registros na Europa mostrou resultados semelhantes. A sobrevida câncer específico foi de 68,9% pelos registros que incluíram um total de 5788 pacientes. (dos anos de 1983 até 1999) Nos EUA um estudo recente (SINGH et al. 2011) observou que a taxa de sobrevida em cinco anos não mudou de 81,6% durante os anos de 1973-2008.

O estudo de LEE et al. (2011) de pacientes coreanos, observou uma sobrevivência câncer específica de 78% em cinco anos e de 70% em 10 anos (N=33 casos).

O estudo de SAKAMOTO et al. (1996) mostrou a sobrevida aos quatro anos, com uma taxa de mortalidade de 0 % para os fusiformes, mais de 43% para os tumores tipo mistos e de 66% para os epitelióides.

Outro estudo publicado em 2008 de *Eurocare Group* sobre 5788 casos de MMC (VIRGILI et al. 2008) mostrou uma diferença na sobrevida câncer específica de MMC, relacionada às idades de diagnóstico da doença, o gênero e o país de referência. Houve um risco relativo de 2,45 (IC95% de 2,1-2,86) de morte por MMC com uma idade de diagnóstico acima de 75 anos ou mais, comparados com outros pacientes com idades inferior a 54 anos. O excesso de risco para os homens foi um pouco maior do que para as mulheres (1,1), que não foi observado no estudo de COMS. As taxas de sobrevida foram altas em países com uma latitude mais alta como a Noruega e o Reino Unido; 70% em cinco anos. Os países de Europa leste e oeste tinham um tempo de sobrevida menor de 63-65.

DIENER-WEST et al. (2005) relataram uma casuística de 2320 pacientes dos quais 739 (31,9%) morreram com metástases. Neste estudo, a proporção dos pacientes com metástases aumentou com o aumento das dimensões do tumor. Para os tumores definidos com pequenos (DBM menos de 16 mm e altura ≤ 8 mm) as proporções de pacientes com metástases aos 5 anos foram 13% (IC 95 11-15%). Para os tumores com DBM de <16 mm com altura ≤ 8 mm, a incidência de metástases foi de 23% em 5 anos (IC95 de 18-28%) e para os tumores de tamanho grande (DBM de ≥ 16 mm com altura >8 mm) a incidência foi de 43% (IC95% 40-46). As incidências de doença metastática foram de 21%, 35% e 55% aos 10 anos depois de diagnóstico de MMC. Depois do diagnóstico de metástases, o tempo mediano da morte foi inferior a seis meses. Não houve diferença significativa com relação ao tamanho inicial do tumor. Em um ano, 80% dos pacientes foram a óbito e esta porcentagem aumentou até 92 % aos dois anos. Somente oito destes 739 pacientes tinham uma sobrevida por mais de 5 anos; a sobrevida em geral não foi determinada pelo tipo de tratamento recebido.

O COMS (2006) mostrou que pacientes acima de 60 anos ao diagnóstico e um diâmetro basal maior do que 11 mm foram fatores preditivos para o tempo para a morte.

Esta sobrevivência contrasta com as observações de sobrevida média de 12,5 meses com metástases do estudo vindo do *Memorial Sloan Kettering Hospital* em 2005 (RIETSCHER et al. 2005). Os autores reportaram que 22% dos seus pacientes estavam vivos aos quatro anos. Infelizmente, estes autores não tinham acesso aos dados do tumor primário no olho.

Um estudo de tratamento com rutênio 106 (LOMMATZSCH et al. 2000) observou uma taxa de sobrevida câncer específica aos cinco, 10,15, e 20 anos (sobrevida cumulativa) de 89,6%, 81,0%, 66,7% e 61,3%.

5.2 PARTE MOLECULAR

5.2.1 Condição dos blocos

Os blocos mais antigos utilizados neste estudo vieram de 1988. Esta data foi escolhida, porque o uso de formol tamponado foi introduzido na rotina cotidiana no Departamento de Anatomia Patologia um pouco antes desta data. Os anticorpos estavam dentro de prazo de validade e houve confiança de eficiência do produto. Os blocos podem sofrer uma degradação durante este tempo prolongado de armazenagem. Consequentemente, foi feita uma comparação dos valores de marcação, dividindo-se o período de seguimento em quatro grupos de cinco anos para um marcador (AKT). A porcentagem de positividade e negatividade não foi estatisticamente significativa para os quatro grupos ($P=0,21$; Tabela 13). Conclui-se que a qualidade de fixação foi razoavelmente semelhante durante todo este tempo, e os resultados poderiam ser considerados livre da influência deste fator.

Todos os cinco marcadores escolhidos foram testados. 73-89 % destas amostras foram categorizadas como marcação negativa. Esta marcação foi derivada da combinação de quatro escores: negativo (sem cor=0), fraco=1, moderado=2 e forte=3. O grupo negativo foi composto de casos negativos e aqueles com marcação fraca. O termo “positivo” foi utilizado para as escores de moderato e forte. Quase todos os casos desenhados como positivo tiveram com uma marcação moderada; os casos denominados forte foram poucos, para todos os anticorpos (Tabela 14).

5.2.2 Marcadores

PTEN: Neste estudo, 84% dos casos foram considerados negativos pelo IIQ, com somente 16 % (23 casos), mostrando positividade (Figura 12).

No estudo de ABDEL-RAHMAN et al. (2006), também com a IIQ, mostrou uma ausência de marcação por PTEN em 16%. A marcação foi considerada fraca até moderada em comparação com os tecidos saudáveis e os controles internam (grau +), em mais 42,7% o outro 38,2% mostrou uma marcação considerada mais intensa (grau ++). Observa-se que o grupo dividiu as amostras em três: sem marcação alguma, com marcação fraca até moderada, e forte. Adicionalmente, eles avaliaram os escores em termos de intensidade (0-3) e a porcentagem das células marcadas foram de 1-100%. O escore final foi obtido pela multiplicação. Nosso estudo utilizou uma intensidade de 0-3, dividindo cada fragmento em quatro partes. O escore final foi a soma destes dois números.

Estes dois estudos tiveram resultados semelhantes, ou seja, a marcação por PTEN não acontece em todos os casos. O estudo de HACC tinha poucos casos (11%) com marcação positiva, enquanto um valor semelhante (mais não feito da mesma maneira) do outro grupo foi de 38%.

DANKORT et al. (2009) bloquearam a ação de PTEN e o desenvolvimento de tumores de melanoma, por meio de inibidores de mTOR ou MEK1/2. É possível que a via de PI3K não tivesse tanta importância na ativação de células malignas do que a via que começasse com RAS e BRAF. É importante lembrar que o PTEN é influenciado por esta via porque estas duas vias se interagem sob as condições dentro do ambiente bioquímico.

PI3K: Este estudo do HACC observou uma negatividade de 89% com a positividade de 11% para o marcador PI3K (Figura 13). A positividade foi associada com um SCE em cinco anos de 81%, mas isto não foi estatisticamente significativo, comparando com os casos negativos ($P=0.85$). Um estudo de BABCHIA et al. (2010)

observou que uma eliminação do sinal de PI3K poderia diminuir a produção de 71-84% da proliferação celular, acompanhado para um aumento na apoptose.

AKT e AKT Fosforilado O estudo de PÓPULO et al. de 2010 mostrou uma alta expressão de AKTfos (pAKT Thr 308) em três casos que desenvolveram metástases (30 casos de UMM em total na casuística) com uma significância de $P=0,02$ Figura 14).

No estudo de HACC, não houve significância com fator preditivo de metástases o AKTfos (nem o AKT com $P=0,42$, e $0,31$ respectivamente) (Figura 15). Opondo-se ao observado por estudo de SARAIVO et al. (2005), em 34 amostras, onde a expressão de AKTfos foi associada ao risco maior de desenvolvimento de metástases ($P=0,02$). Para a sobrevida câncer específico em cinco anos, os resultados mostraram um aumento de sobrevida para a positividade destes dois marcadores; isto foi registrada com um menor incremento de RR (para o tempo de estudo inteiro); porém não significativo pelo RR ($P=0,22$ para o AKT e $P=0,84$ para o AKT fos).

Em suma, os resultados de IIQ nestes quatro marcadores não indicaram uma diferença significativa entre os níveis de positividade e negatividade em geral, nem em termos de desenvolvimento ou não de metástases.

Em nossa casuística, não tivemos tecidos normais para concluirmos qual seria o padrão normal para classificarmos um olho sadio.

Neste estudo foram comparados somente os tumores que desenvolveram metástases versus aqueles que não se desenvolveram. O estudo de PÓPULO et al. (2010) indicou que os tecidos subjacentes principalmente a retina e epitélio de corpo ciliar marcaram negativamente ou fracamente.

Observou-se que os MMC nem sempre seguem as vias moleculares de melanomas cutâneos, como, por exemplo, a ativação de via de RAS/BRAF. Embora MAAT et al. (2008), utilizando a técnica de pirophosphorolysis, detectou-se em 13% de

amostras de MMC, uma mutação de BRAF V600. Concluiu-se que esta via não tem um grande papel no desenvolvimento de metástases em MMC. Por esta razão pareceu interessante estudar a via de PI3K. A via de PI3K não tem muito a ver com o desenvolvimento de metástases de MMC. Um oncogene chamado GNAQ foi entusiasticamente estudado, recentemente. Observou-se que este gene foi mutado em 46% das amostras de MMC (VAN RAAMSDONK et al. 2009), sugerindo que a mutação poderia ativar o MAP kinase, e a progressão de melanoma. O grupo de Bauer (BAUER et al. 2009) não mostrou nenhuma modificação em SLD em MMC ($P=0,559$). É possível que uma mutação do GNAQ coopere com outra mutação em uma outra via (mutações, modificações e assim por diante) para ter um efeito no desenvolvimento de metástases em MMC (SISLEY et al. 2011). Outro gene de interessa, o BAP1, localizado no cromossomo 3p12, foi identificado com 47,4% de mutações somáticas em MMC. Este gene foi associado a um padrão de expressão genética fortemente associada (em 84% dos casos) com metástases (HARBOUR et al. 2010). Este gene foi identificado em MMC familiares (ABDEL-RAHMAN et al. 2011).

Conclui-se que outros mecanismos não genéticos como, por exemplo, as mudanças epigenéticas (metilação de DNA, ou modificações de miRNA entre outras) possam ter um papel em outras partes de cascata de malignidade, mais importante do que a via de PI3K em MMC.

O mTOR de TMA 2 e 3, utilizando marcador de fabricante de Millipore, deu resultados de olho nu bem diferentes (a marcação foi definitivamente mais forte com o anticorpo de Millipore) de TMA 1, que foi feito anteriormente com o anticorpo de Abcam. Assim, uma avaliação estatística, comparando os resultados foi aplicada (Tabela 15). O resultado mostrou uma diferença significativa entre as medidas de

positividade e negatividade das amostras; por isto, os resultados utilizando os marcadores de mTOR foram desconsiderados.

Localiza-se, aproximadamente 10 olhos em parafina enucleados por outros tipos de tumores nas pálpebras: as amostras de globo ocular normal não foram incluídos. Muitos estudos na literatura não utilizaram controlos de olho normal, por causa de sua escassez. Alguns estudos utilizaram tecidos subjacentes do mesmo olho com o tumor.

Para todos os marcadores, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre a positividade ou negatividade do marcador e o desenvolvimento ou não de metástases (Tabela 16). O valor de P para o PTEN foi o mais perto de significância, mas, ainda ficou em $P=0,20$, enquanto os outros valores de P ficaram mais altos.

Estes resultados mostraram que não houve uma influência no desenvolvimento ou não de metástases de valores destes marcadores. Sobretudo, um valor positivo ou negativo (de acordo com este estudo) não tem valor como indicador para o desenvolvimento de tumores metastáticos.

5.3 CURVA DE ROC E FISH POR PTEN

A curva de ROC foi feita para determinar a ponte de corte para as deleções de PTEN, utilizando o método de FISH (Figura 9). Por enquanto, não houve na literatura um valor em porcentagens estabelecido que possa indicar a quantidade de deleções (ou amplificações) necessárias para danificar uma célula. As curvas de ROC estão sendo utilizadas para avaliar o poder discriminatório de testes de diagnóstico. Na curva baseada nos resultados de PTEN por FISH em MMC, a melhor sensibilidade possível foi de 41% e a especificidade, correspondente foi de 72%, para a amostra do HACC. A ponte de corte para a porcentagem de deleções necessárias para obter esses valores foi

de 40,7%. A área abaixo da curva foi de 56,6%, mostrando que o teste não foi muito melhor do que azar (manual de MedCalc). Baseado nestes valores, concluiu-se que o teste de FISH para determinar o número de deleções não é indicado para o diagnóstico de desenvolvimento de metástases. Calculou-se que o ponto da corte de 41%, dado pela curva de ROC. Com isto, no teste de Qui Quadrado com P de significância ao $< 0,05$, foi obtido um $P=0,078$, com um RR de 1,369 (IC95% de 0,9701-1,933: Graph Pad Prism v 5 e). Nestes cálculos, houve um Valor Positivo Preditivo (PPV) de 0,06277 com um Valor negativo Preditivo de 0,5417. Assim, confirmou-se que o teste de FISH por PTEN não funciona suficientemente bem para ser utilizado como teste de diagnóstico.

No mesmo estudo citado acima para o IIQ com PTEN (ABDEL-RAHMAN et al. 2006) hibridização comparativo genético (CGH) foi feito com 13 amostras e observou-se uma perda de cromossomo 10q em 13 %. Em uma amostra maior, de 38 casos, utilizando PCR para determinar perda de homozigoto (Loss of Heterozygosity LOH), com três marcadores polimórficos ao lado e dentro de gene de PTEN, o grupo observou uma perda de heterozigoto (LOH) em ao menos um marcador em 76,3% e uma perda de dois marcadores em 39,5% dos casos. É provável que a IIQ não tenha sensibilidade suficiente para identificar as sub-deleções (submicroscopic hemizygous deletions) como foram identificados, utilizando o método de LOH e PCR.

5.4 FATORES DE RELEVÂNCIA POSSÍVEL PELA SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES

Em nosso estudo, seis fatores clínicos foram avaliados para sua influência no comportamento eventual do tumor: gênero, tratamento com enucleação primário ou

secundário, histologia de tumor, volume estimada pelo método de COMS e de Gass (Tabelas 17 e 18).

Os homens tinham uma SLD em cinco anos de 65% enquanto as mulheres tinham porcentagem diminuída de 54%. Observando o tempo de seguimento total (até mais de 20 anos por alguns pacientes), o risco relativo (RR) para ser uma mulher e desenvolver as metástases durante o tempo todo e de 1,27, comparado aos homens; porém, este valor não chegou perto da significância estatística ($P=0,22$).

Os resultados de tratamentos de braquiterapia primeira com uma enucleação indicam que uma demora com a enucleação, não prejudicou os resultados de SLD nem de RR. As porcentagens de SLD foram 66% para a braquiterapia enquanto para um tratamento com uma enucleação primária deu 57%. O RR para enucleação foi de 57%, mas o RR tinha um $P=0,18$ ($P < 0,05$ define o nível de significância). Observou-se que o tumor precisa ter medidas suficientemente menores para utilizar uma placa radioativa com tratamento primário.

Foi um propósito de um membro da banca que os dois grupos tratados (braquiterapia antes de enucleação e grupo com enucleação secundário) possam ser considerados como tumores de comportamento biológico diferentes. Porém nossos resultados destes grupos nem em termos de incidência de doença metastática e SCE e SLD, não foram estatisticamente diferentes.

Na literatura a incidência de crescimento de tumor depois da iniciação de uso braquiterapia, foi mais alta do que está sendo reportado hoje. A publicação a mais recente que descobri veio de Liverpool (DAMATO et al. 2005) que obteve uma incidência de 3% de recorrência de crescimento de tumor, depois da braquiterapia aos 7 anos. Em nosso estudo foi de 25%.

Na literatura, os fatores que favorecem um bom resultado incluem os seguintes: utilização de uma placa que vai estender ao menos 2 mm ao redor de tumor, uma colocação da placa para que o tumor estaria completamente e adequadamente tratada em todas as margens, uma dosagem suficiente (normalmente considerado de 70-80 Gy). Adicionalmente, para um seguimento depois é imprescindível ter boa documentação da aparência de tumor antes de tratamento. Isto pode ser feito por meio fotográfico (é preferível) mas um bom desenho feito com acurácia, corretamente localizado, incluindo todos os parâmetros necessários também é aceitável.

Porém, em nosso estudo, não houve nem qualquer desenho deste tipo acima descrito nem qualquer foto feita disponível nos prontuários nesta época. Por isto foi impossível avaliar posteriormente se o tratamento fosse feito de uma maneira adequada ou não.

Apesar disto, para acertar se tumores tratados como braquiterapia adicionalmente tivessem um comportamento biológico diferente daqueles tratados com sucesso utilizando este método, seria necessário ter tecidos para ser comparados. Obviamente, com um tratamento com braquiterapia que consegui matar o tumor, nunca vamos ter estes tecidos para ser comparados (durante a vida desses pacientes).

Por tudo acima descrita, acredito que nós não podemos considerar nosso grupo de pacientes tratados com braquiterapia que subsequentemente precisaram de uma enucleação como um grupo de comportamento biológico diferente.

Os valores de SLD em nosso estudo são concordes com a literatura, sendo que aqueles tumores tipo fusiforme, tinham um melhor prognóstico para sobrevida sem metástases do que os outros tipos, de 71% em 5 anos. Os tipos mistos e epitelióides deram valores de SLD em cinco anos de 51% cada um. Os epitelióides tinham um RR

de 2,04 comparados aos mistos com 1,88, e os fusiformes com um RR de 1. Estes valores de RR foram significativos estatisticamente ($P=0,02$).

Os valores de volume, utilizando o esquema de COMS não deram significância em termos de RR com $P=0,22$) embora que as porcentagens de SLD em cinco anos parecem ter diferenças importantes de 81% sobrevida para tumores de tamanho pequeno, 60% para os tumores médios, e 54% para os tumores de grande porte. Os valores de RR para os três foram de 1; 2,69; e 3,13, respectivamente.

De outro lado, utilizando a fórmula de volume de Gass, e separando os tumores pela mediana de volume, observou-se em cinco anos um SLD de 65% para os tumores menores do que a mediana, e de 51% para os tumores maiores. Os RR para estes valores foram de 1 para os menores e 1,58 para aqueles acima da mediana ($P=0,02$).

Os resultados de Sobrevida Câncer Específico em cinco anos (SCE, onde a condição de censura é definida como uma morte relacionada diretamente ao MMC por metástases) mostraram valores de sobrevida maiores para ambos os sexos (Tabela 17). Os homens tinham um SCE de 77% enquanto as mulheres tinham 70%. O RR foi de 1,15 com um valor de $P=0,54$.

Em nosso estudo, como já foi descrito para a SLD em cinco anos, o tratamento com braquiterapia, primeiramente, e em seguida a enucleação não fez nenhuma diferença na SCE, com valores de sobrevida de 75% para a placa, seguida pela enucleação comparados aos 72% para a enucleação primária. Os valores de RR foram de 1 e 1,02 com um $P=0,95$. O COMS (1998b), comparando o tratamento de irradiação e enucleação em seguida, tinha um SCE de cinco anos de 62% e para enucleação de 57%. Eles obtiveram um RR de 1.03 para o grupo recebendo ambos os tratamentos.

De maneira semelhante os valores para SCE em cinco anos em nosso estudo para a variável de histologia revelaram uma SCE de 82% para tumores tipo fusiformes,

de 61% para os epitelióides e de 68% para os mistos. O RR ao longo prazo no seguimento foi de 1 para os fusiformes, 2,73 para os epitelióides e 2,18 para os mistos, dando um valor de $P < 0,0001$.

Em termos de volume calculado pelo método de COMS, para os tumores nesta amostra, houve uma diminuição de SCE de 79% para os tumores de pequeno porte, seguidos pelos tumores médios com 75% e os grandes com 69% em 5 anos. Os valores de RR para cada um foram de 1; 1,89; e 2,26; com um $P=0,43$.

Para os volumes calculados usando o método de Gass a sobrevida (SCE) foi de 74% para os tumores abaixo do tamanho da mediana, e de 69% para aqueles acima. O RR ao longo prazo foi de 1 e 1,38 com um valor de $P=0,15$. Então, o volume (Método de Gass) para o SCE em cinco anos não teve significância estatística, apesar de ser útil para prever a SLD em cinco anos.

A presença ou ausência de metástases foi o mais importante em termos de SCE em cinco anos com um valor de 100% sobrevida para os pacientes que não tiveram metástases versus uma sobrevida de 39% para aqueles que se desenvolveram as metástases. O RR ao longo prazo foi de 1 versus $2 \times 10^{+9}$ (IC95% 0 até ∞). Na curva de Figura 10, é possível observar que o tempo de seguimento foi acima de 150 meses. O tempo para que 50% dos pacientes morressem de metástases foi de somente 45 meses, neste estudo. Diferentemente dos resultados obtidos pelo COMS em que todos os pacientes diagnosticados com metástases tiveram uma sobrevida média de seis meses (DIENER-WEST 2004).

DIENER-WEST et al. (2004) mostraram uma taxa de sobrevida global, comparando dois grupos de tumores de tamanho maior, a enucleação com irradiação feita imediatamente antes de enucleação, de 41% aos dez anos. Para o grupo recebeu somente enucleação a taxa de SCE aos dez anos foi de 40%.

Nosso grupo de pacientes não tinha as vantagens de seguimento feito somente no H.A.CC. Assim, nossos dados provavelmente diferem daqueles de COMS, especificamente para os dados de SCE e RR aos cinco anos. É possível que nosso estudo tenha sido influenciado por causa de censuras que aconteceram durante o estudo, enquanto o estudo COMS, sendo randomizado e controlado, tinha tido poucas dificuldades.

O uso de marcadores para separar tumores primários e que desenvolveram metástases, não funcionou. A marcação de todos os marcadores, sejam positivos ou negativos, não deram valores muito diferentes em termos de sobrevida (SLD) em cinco anos nem para o RR no seguimento total. Os valores de P ficaram os seguintes: 0,15 para o AKT, 0,5 para o AKT fosforilado; 0,82 para o PI3K e 0,19 para o PTEN (Tabela 20).

Observou-se que a SLD ficou maior (apesar de não tem significância) enquanto o valor do marcador foi positivo em vez de negativo. Somente o AKT fosforizado que tinha uma SLD maior (de 59% versus 47% em cinco anos) foi à exceção, os valores negativos resultaram numa SLD maior. Sabe-se que uma ativação de AKT fosforilado deve bloquear os níveis de TSC, permitindo o Rheb ficar desbloqueado, resultando na *upregulation* ou aumento de expressão de mTORC1 e eventualmente uma produção aumentada de proteínas relevantes para o crescimento do tumor.

Quanto a SCE em cinco anos e a marcação positivo ou negativo, todos os marcadores tiveram uma positividade na marcação associada a um aumento de SCE em cinco anos, sem exceção. Esta vantagem foi mínima e não atingiu uma significância estatisticamente significativa para nenhum marcador (Tabela 20). Todos os valores de P foram grandes: AKT 0,22; AKT fosfor 0,84; PI3K 0,87; e PTEN 0,22.

A Figura 10 mostra a diferença em sobrevida entre o grupo que nunca desenvolveu as metástases e aqueles que tinham. O tempo mediano de sobrevida do grupo sem metástase foi de 2577 dias (um pouco mais de sete anos de seguimento) versus 1289 dias (3,53 anos) de sobrevida média para o grupo com metástases.

O tempo mediano de sobrevida câncer específico, ou seja, o tempo que demorou até que 50% morressem por câncer de coróide foi de 45 meses (44.61m). Os membros do grupo sem metástases (e sem morte por câncer) tinham um tempo médio de seguimento superior a sete anos.

No modelo múltiplo (análise multivariada de Cox) para o SCE em cinco anos somente o tipo histológico da célula ficou com significância (Tabelas 22 e 23). Comparado ao tipo fusiforme, os tumores de células epitelióides tinha um RR de 3,51 vezes mais de falecer por MMC ($P=0.0033$). O tipo misto tinha um RR de 2,18 vezes maior ($P=0,543$). O PTEN negativo comparando ao PTEN positivo (com $RR=1$) deu um RR de 2,47 vezes maior de morte em cinco anos por MMC ($p=0,0867$, IC95% 0,88-6,96). Estes dados não foram significantes.

Em termos de SLD em cinco anos, o tipo histológico continua com uma variável de prognóstico independente. Mais uma vez o tipo epitelióide foi associado com um alto RR de 2,58 ($P=0,0142$), enquanto o misto tinha um RR de 2,10 ($P=0,0403$.) A presença de um PTEN negativo continuou perto de significância, com um $P=0,1457$. Apesar de ter um valor mais alto do que foi encontrado na SCE onde o $P=0,0867$, indica que a negatividade (relativa) de PTEN que é um gene supressor para o PI3K, pode ter importância em regular a atividade de via de PTEN neste sistema de MMC.

Teria sido mais interessante, do meu ponto de vista, se tivessem resultados significantes para discutir. Porém, sendo os resultados negativos em grande parte, para os marcadores utilizados indicam que estes marcadores não têm importância em MMC.

De outro lado, esta via fica no centro das atividades de proliferação celular. Poderia ser que, com outros métodos, e adicionando outros marcadores de mesmo via, estejam mostrados um envolvimento importante. Estes estudos ficaram para o futuro.

4 CONCLUSÕES

- 1) As expressões imunoistoquímica das proteínas da via PI3K (PI3K, PTEN, AKT, AKTfosforilado e mTOR foram estudadas de ponto de vista de todos os pacientes selecionados, e depois, separados na base de desenvolvimento ou não de metástases. Em termos globais, houve uma expressão negativa na maioria das amostras;
- 2) As alterações do gene PTEN foram estudadas por FISH. Foram observados somente deleções do sinal de PTEN. Utilizando os resultados da curva de ROC, o FISH não está sendo um bom teste diagnóstico para prever as metástases;
- 3) As principais características demográficas e histopatológicas dos MMC diagnosticados e enucleados no Hospital AC Camargo no período de 1988 até 2005 foram identificadas. Algumas características de nosso grupo de pacientes ficam bem semelhantes às descritas na literatura, principalmente da Europa, enquanto outros dados ficam mais pertos daqueles reportados dos países fora da Europa;
- 4) Os dados de IIQ foram correlacionados com os dados clínicos e histológicos de MMC. A negatividade ou positividade dos marcadores não fez diferença em termos de desenvolvimento ou não de metástases. O volume cruzado com os tipos de célula também não ficou com significância estatística. Na análise de modelo multivariado, somente a histologia de tumor ficou com significância, quanto comparado com todas as variáveis. A negatividade de PTEN chegou perto de significância estatística relacionada ao tipo de histologia, para ambos a SCE em cinco anos e o RR;

- 5) Os resultados imunoistoquímicas foram correlacionados com a sobrevida câncer específica por cinco anos e com o RR pela duração de seguimento disponível, para os tumores MMC com e sem metástases.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Rahman MH, Yang Y, Zhou X-P, Craig EL, Davidorf FH, Eng C. High frequency of submicroscopic hemizygous deletions is a major mechanism of loss of expression of PTEN in uveal melanoma. **J Clin Oncol** 2006; 24:288-95.

Abdel-Rahman MH, Pilarski R, Cebulla CM, et al. Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers. **J Med Genet** 2011; 48:856-9.

Alsuhaibani AH. Uveal melanoma in the Saudi Arabian population: two decades of management at the King Khaled Eye Specialist Hospital. **Saudi J Ophthalmol** 2009; 23:157-63.

Ashida A, Takata M, Murata H, Kido K, Saida T. Pathological activation of KIT in metastatic tumors of acral and mucosal melanomas. **Int J Cancer** 2009; 124:862-8.

Augsburger JJ, Corrêa ZM, Shaikh AH. Quality of evidence about effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma. **Trans Am Ophthalmol Soc** 2008; 106:128-37; discussion 135-7.

Avery RB, Diener-West M, Reynolds SM, Grossntklaus HE, Green R, Albert DM. Histopathologic characteristics of choroidal melanoma in eyes enucleated after iodine 125 brachytherapy in the collaborative ocular melanoma study. **Arch Ophthalmol** 2008; 126:202-12.

Aziz AS, Davies M, Pick E, et al. Phosphatidylinositol-3-Kinase as a therapeutic target in melanoma. **Clin Cancer Res** 2009; 15:3029-36.

Babchia N, Calipel A, Mouriaux F, Faussat AM, Mascarelli F. The PI3K/mTOR/P70S6K signalling pathways in human uveal melanomas cells: interaction with B-Raf /ERK. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2010; 51:421-9.

Bansal N, Yendluri V, Wenham RM. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. **Cancer Control** 2009; 16:8-13.

Bernards R. It's diagnostics stupid. **Cell** 2010; 141:13-7.

Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Bröcker EB, Pinkel D. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas determined by comparative genomic hybridization. **Cancer Res** 1998; 58:2170-5.

Bastian BC, Oishen AB, LeBoit PE, Pinkel D. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. **Am J Pathol** 2003; 163:1765-70.

Bauer J, Kilic E, Vaarwater J, Bastian BC, Garbe C, de Klein A. Oncogenic *GNAQ* mutations are not correlated with disease-free survival in uveal melanoma. **Br J Cancer** 2009; 101:813-5.

Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. **Clin Cancer Res** 2008; 14:6821-8.

Bergaman L, Seregard S, Nilsson B, Lundell G, Ringborg U, Ragnarsson-Olding B. Uveal melanoma survival in Sweden from 1960-1998. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2003; 44:3282-7. and BERGMAN

Biswas J, Krishnakumar S, Shanmugam MP. Uveal melanoma in Asian Indians: a clinicopathological study. **Arch Ophthalmol** 2002; 120:522-3.

Biswas J, Kabra S, Krishnakumar S, Shanmugam MP. Clinical and Histopathological characteristics of uveal melanoma in Asian Indians. A study of 103 patients. **Ind J Ophthalmol** 2004; 52:41-44.

Bronkhorst IHG, Maat W, Jordanava ES, et al. Effect of heterogeneous distribution of monosomy 3 on prognosis in uveal melanoma. **Arch Pathol Lab Med** 2011; 135:1042-7.

Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, et al. Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **J Clin Invest** 2007; 117:2713-22.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **N Engl J Med** 2011; 364:2507-16.

Char DH, Kroll S, Phillips TL, Quivey JM. Late radiation failures after Iodine 125 brachytherapy for uveal melanoma compared with charged-particle (proton or helium) therapy. **Ophthalmology** 2002; 109:1850-4.

Cheung M, Sharma A, Madhunapantula SV, Robertson GP. Akt3 and mutant V600E B-Raf cooperate to promote early melanoma development. **Cancer Res** 2008; 68:3429-39.

Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Parrella P, et al. Lack of BRAF mutation in primary uveal melanoma. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2003; 44:2876-8.

[COMS] Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Mortality in patients with small choroidal melanoma. COMS report no. 4. The Collaborative Ocular Melanoma Study Group. **Arch Ophthalmol** 1997a; 115:886-93.

[COMS] Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Factors predictive of growth and treatment of small choroidal melanomas. COMS Report no 5. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. **Arch Ophthalmol** 1997b; 115:1537-44.

[COMS] Collaborative Ocular Melanoma Study Group. The Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS) randomized trial of pre-enucleation radiation of large choroidal melanoma I: characteristics of patients enrolled and not enrolled. COMS no. 9. **Am J Ophthalmol** 1998a; 125:767-78.

[COMS] Collaborative Ocular Melanoma Study Group. The Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS) randomized trial of pre-enucleation radiation of large choroidal melanoma II: initial mortality findings. COMS report No 10 **Am J Ophthalmol** 1998b; 125:779-96.

[COMS] Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Assessment of metastatic disease status at death in 435 patients with large choroidal melanoma in the Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS). COMS Report No. 15. **Arch Ophthalmol** 2001; 119:670-6.

[COMS] Collaborative Ocular Melanoma Study Group. The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma: V. Twelve-year mortality rates and prognostic factors: COMS Report No.28. **Arch Ophthalmol** 2006; 124:1684-93.

Cruz F 3rd, Rubin BP, Wilson D, et al. Absence of BRAF and NRAS mutations in uveal melanoma. **Cancer Res** 2003; 63:5761-6.

Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. **J Clin Oncol** 2006; 24:4340-6.

Damato B. **Ocular tumors: diagnosis and treatment**. Oxford: Publishers Butterworth-Heinemann; 2000. Uveal melanoma; p.58-93.

Damato B. Time to treatment of uveal melanoma in the United Kingdom. **Eye (Lond)** 2001; 15:155-8.

Damato B, Patel I, Campbell IR, Mayles HM, Errington RD. Local tumor control after 106Ru brachytherapy of choroidal melanoma. **Int J Radiat Onc Bio Phys** 2005; 62:385-91.

Dankort D, Curley DP, Cartledge RA, et al. BRaf (V600E) cooperates with PTEN loss to induce metastatic melanoma. **Nat Genet** 2009; 41:544-52.

Davies MA, Stemke-Hale K, Lin E, et al. Integrated molecular and clinical analysis of AKT Activation in Metastatic Melanoma. **Clin Cancer Res** 2009; 15:7538-46.

Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, et al. Oncogenic braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. **Cancer Cell** 2009; 15:294-303.

Diener-West M, Renolds SM, Agugliaro DJ, et al. Screening for metastases from choroidal melanoma: The Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report 23. **J Clin Oncol** 2004; 22:2438-44.

Diener-West M, Reynolds SM, Agugliaro DJ, et al. Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report No.26. **Arch Ophthalmol** 2005; 123:1639-43.

Edmunds Sc, Cree IA, Di Nicolantonio F, Hungerford JL, Hurren JS, Kelsell DP. Absence of BRAF gene mutations in uveal melanomas in contrast to cutaneous melanomas. **Br J Cancer** 2003; 88:1403-5.

Eskelin S, Kivelä T. Mode of presentation and time to treatment of uveal melanoma in Finland. **Br J Ophthalmol** 2002; 86:333-8.

Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma. **Curr Opin Oncol** 2008; 20:183-9.

Gaudi S, Messina JL. Molecular basis of cutaneous and uveal melanomas. **Patholog Res Int** 2011; 2011:159421.

Gerami P, Jewell SS, Morrison LE, et al. Fluorescence in-situ Hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. **Am J Surg Pathol** 2009; 33:1146-56.

Gerami P, Zembowicz A. Update on fluorescence in situ hybridization in melanoma. **Arch Pathol Lab Med** 2011; 135:30-7.

Gibbons A. Human evolution. Aboriginal genome shows two-wave settlement of Asia. **Science** 2011; 333:1689-91.

Graell X, Caminal JM, Masuet C, et al. Age distribution of uveal melanoma and its relationship to survival. **Arch Soc Esp Oftalmol** 2007; 82:343-7.

Guénel P, Laforest L, Cry D, et al. Occupational risk factors, ultraviolet radiation, and ocular melanoma: a case control study in France. **Cancer Causes Control** 2001; 12:451-9.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, et al. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. **Science** 2010; 330:1410-3.

Hu DN, Yu GP, McCormick SA, Schneider S, Finger PT. Population-based incidence of uveal melanoma in various races and ethnic groups. **Am J Ophthalmol** 2005; 140:612-7.

Hu DN, McCormick SA, Yu GP. Latitude and uveal melanoma. **Ophthalmology** 2008; 115:757.

Isager P, Osterlind A, Engholm G et al. Uveal and conjunctival melanoma in Denmark, 1943-97: Incidence and validation study. **Ophthalmic Epidemiol** 2005; 12:223-32.

Jampol LM, Moy CS, Murray TG, et al. The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma: IV. Local treatment failure and enucleation in the first 5 years after brachytherapy. COMS Report no.19. **Ophthalmology** 2002; 109:2197-206.

Janssen CS, Sibbett R, Henriquez FL, McKay IC, Kemp EG, Roberts F. The T1799A point mutation is present in posterior uveal melanoma. **Br J Cancer** 2008; 99:1673-7.

Khan MK, Khan N, Almasan A, Macklis R. Future of radiation therapy for malignant melanoma in an era of newer more effective biological agents. **Onco Targets Ther** 2011; 4:137-48.

Kiliç E, Bruggenwirth HT, Verbiest MM, et al. The RAS-BRAF kinase pathway is not involved in uveal melanoma. **Melanoma Res** 2004; 14:203-5.

Kiliç E, Naus NC, van Gils W, et al. Concurrent loss of chromosome arm 1p and chromosome 3 predicts a decreased Disease-Free Survival in uveal melanoma patients. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2005; 46: 2253-7.

Kim D, Sun M, He L, et al. A small molecule inhibits Akt through direct binding to Akt and preventing Akt membrane translocation. **J Biol Chem** 2010; 285:8383-94.

Kodjikian L, Grange JD, Baldo S, Baillif S, Garweg JG, Rivoire M. Prognostic factors of liver metastases from uveal melanoma. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol** 2005; 243:985-93.

Kong Y, Kumar SM, Xu X. Molecular pathogenesis of sporadic melanoma and melanoma-initiating cells. **Arch Pathol Lab Med** 2010; 134:1740-9.

Korotchkina LG, Leontieva OV, Bukreeva EI, Demidenko ZN, Gudkov AV, Blagosklonny MV. The choice between p53 induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. **Aging (Albany NY)** 2010; 2:344-52.

Kujala E, Mäkitie T, Kivelä T. Very long term prognosis of patients with malignant uveal melanoma. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2003; 44:4651-9.

Kuo PK, Puliafito CA, Wang KM, Liu HS, Wu BF. Uveal melanoma in China. **Int Ophthalmol Clin** 1982; 22:57-71.

Lake SL, Copeland SE, Taktak AFG, Damato BE. Whole genome microarray detects deletion and loss of heterozygosity of chromosome 3 occurring exclusively in metastasizing uveal melanoma. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2010; 51:4884-91.

Lee CS, Lee J, Choi JJ, et al. Cytogenetics and prognosis for uveal melanoma in Korean patients. **Acta Ophthalmol** 2011; 89:e310-4.

Lefevre G, Glotin AL, Calipel A, et al. Roles of stem cell factor/c-Kit and effects of Glivec/STI571 in human uveal melanoma cell tumorigenesis. **J Biol Chem** 2004; 279:31769-79.

Li L, Ross AH. Why is PTEN an important tumor suppressor? **J Cell Biochem** 2007; 102:1368-74.

Ligresti G, Militello L, Steelman LS, et al. PI3KCA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches. **Cell Cycle** 2009; 8:1352-8.

Limdi NA, Wadwli M, Cavallari L, et al. Warfarin pharmacogenetics: a single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups. **Blood** 2010; 115:3827-34.

Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of 28 ancestry informative SNPs. **Am J Hum Biol** 2010; 22:187-92.

Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, et al. Genetic heterogeneity of self-reported ancestry groups in an admixed Brazilian population. **J Epidemiol** 2011; 21:240-5.

Liu S, Ren S, Howell P, Fodstad O, Riker AI. Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. **Pig Cell Mel Res** 2008; 21:545-58.

Lommatzsch PK, Werschnik C, Schuster E. Long-term follow-up of Ru-106/Rh106 brachytherapy for posterior uveal melanoma. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol** 2000; 238:129-37.

Maat W, Jordanova ES, van Zelderen-Bhola SL, et al. The heterogeneous distribution of monosomy 3 in uveal melanomas: implications for prognostication based on fine needle aspiration biopsies. **Arch Path Lab Med** 2007; 131:91-6.

Maat W, Kilic E, Luyten GP, et al. Pyrophosphorolysis detects B-RAF mutations in primary uveal melanoma. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2008; 49:23-7.

Madhunapantula SV, Robertson GP. The PTEN-AKT3 signaling cascade as a therapeutic target in melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res** 2009; 22:400-19.

Margo CE. The Collaborative Ocular Melanoma Study: an overview. **Cancer Control** 2004; 11:304-9.

Margo CE, Mulla Z, Billiris K. Incidence of surgical treated uveal melanoma by race and ethnicity. **Ophthalmology** 1998; 105:1087-90.

Mariani P, Piperno-Neumann S, Servois V, et al. Surgical management of liver metastases from uveal melanoma: 16 years' experience at the Institut Curie. **Eur J Surg Oncol** 2009; 35:1192-7.

Martelli AM, Evangelista C, Chiarini F, McCubrey JA. The phosphatidylinositol 3-kinase /Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. **Oncotarget** 2010; 1:89-103.

Merhavi E, Cohen Y, Avraham BC, et al. Promotor methylation status of multiple genes in uveal melanoma. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2007; 48:4403-6.

Michailidou C, Jones M, Walker P, Kamarashev J, Kelly A, Hurlstone AF. Dissecting the roles of Raf-and the PI3K-signalling pathways in melanoma formation and progression in a zebrafish model. **Dis Model Mech** 2009; 2:399-411.

Miller B, Abrahams C, Cole GC, Proctor NS. Ocular malignant melanoma in South African blacks. **Br J Ophthalmol** 1981; 65:720-2.

Moore MW, Gasparini R. FISH as an effective diagnostic tool for the management of challenging melanocytic lesions. **Diagn Pathol** 2011; 6:76-81.

Mouriaux F, Kherrouche Z, Maurage CA, Demailly FX, Labalette P, Saule S. Expression of the c-kit receptor in choroidal melanomas. **Melanoma Res** 2003; 13:161-6.

NHS Cancer Services. **Cancer Reform Strategy**. Available from: <URL:http://www.dh.gov.uk/en/Publicationsandstatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuidance/DH_081006> [2011 nov 28].

Naus NC, Verhoeven ACA, van Drunen CM, Paridaens DA, Luyten GPM, de Klein A. Detection of genetic prognostic markers in uveal melanoma biopsies using Fluorescence *in situ* Hybridization. **Clin Cancer Res** 2002; 8:534-9.

North JP, Vetto JT, Murali R, White KP, White CR, Bastian BC. Assessment of copy number status of chromosome of 6 and 11 by FISH provides independent prognostic information in primary melanoma. **Am J Surg Pathol** 2011; 35:1146-50.

Onken MD, Worley LA, Long MD, et al. Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2008; 49:5230-4.

Panasyuk G, Nemazanyy I, Zhvloup A, et al. mTOR β splicing isoform promotes cell proliferation and tumorigenesis. **J Biol Chem** 2009; 284:30807-14.

Pena SD, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. **Braz J Med Biol Res** 2010; 42:870-6.

Perone C, Medeiros GS, Del Castillo DM, de Aguiar MJB, Januário JN. Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening. **Br J Med Biol Res** 2010; 43:134-8.

Phillpotts BA, Sanders RJ, Shields JA, Griffiths JD, Augsburger JA, Shields CL. Uveal melanoma in black patients: a case series and comparative review. **J Natl Med Assoc** 1995; 87:709-14.

Pons F, Plana M, Caminal JM, et al. Metastatic uveal melanoma: is there a role for conventional chemotherapy? – A single center study based on 58 patients. **Melanoma Res** 2011; 21:217-22.

Pópulo H, Soares P, Rocha AS, Silva P, Lopes MJ. Evaluation of the mTOR pathway in ocular (uvea and conjunctiva) melanoma. **Melanoma Res** 2010; 20:107-17.

Pópulo H, Soares P, Faustino A, et al. mTOR pathway activation in cutaneous melanoma is associated with poorer prognosis characteristics. **Pigment Cell Melanoma Res** 2011a; 24:254-7.

Pópulo H, Vinagre J, Lopes JM, Soares P. Analysis of GNAQ mutations, proliferation and MAPK pathway activation in uveal melanomas. **Br J Ophthalmol** 2011b; 95:715-9.

Poynter JN, Elder JT, Fullen DR, et al. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. **Melanoma Res** 2006; 16:267-73.

Prasad R, Sharma H, Kaur G. Molecular basis of cystic fibrosis disease: an Indian perspective. **Indian J Clin Biochem** 2010; 25:335-41.

Prescher G, Bonfield N, Becher R. Nonrandom chromosomal abnormalities in Primary uveal melanoma. **J Natl Cancer Inst** 1990; 82:1765-9.

Pu X, Hildebrandt MA, Lu C, et al. PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway genetic variation predicts toxicity and distant progression in lung cancer patients receiving platinum-based chemotherapy. **Lung Cancer** 2011; 71:82-8.

Richtig E, Langmann G, Muller K, Richtig G, Smolle J. Calculated tumor volume as a prognostic parameter for survival in choroidal melanomas. **Eye (Lond)** 2004; 18:619-23.

Rietschel P, Panageas KS, Hanlon C, Patel A, Abramson DH, Chapman PB. Variates of survival in metastatic uveal melanoma. **J Clin Oncol** 2005; 23:8076-80.

Roa J, Tena-Sempere M. Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTOR signaling. **Trends Endocrinol Metab** 2010; 21:519-28.

Sakamoto M, Sakamoto T, Yoshikawa H, et al. Histologic findings and prognosis of uveal malignant melanoma in Japanese patients. **Am J Ophthalmol** 1996; 121:276-83.

Santos PC, Soares RA, Santos DB, et al. CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. **BMC Med Genet** 2011; 12:13.

Saraivo VS, Caissie AL, Segal L, Edelstein C, Burnier MN Jr. Immunohistochemical expression of phospho-Akt in uveal melanoma. **Melanoma Res** 2005; 15:245-50.

Schoenfield L, Pattey J, Tubbs RR, Singh AD. Variation of monosomy 3 status within uveal melanoma. **Arch Pathol Lab Med** 2009; 133:1219-22.

Senetta R, Paglierani M, Massi D. Fluorescence *in-situ* hybridization analysis for melanoma diagnosis. **Histopathology** 2011 Oct 18. [Epub ahead of print]

Seregard S, aft Trampe E, Lax I, Kock E, Lundell G. Results following episcleral ruthenium plaque radiotherapy for posterior uveal melanoma. The Swedish experience. **Acta Ophthalmol Scand** 1997; 75:11-6.

Shah CP, Weis E, Lajous M, Shields JA, Shields CL. Intermittent and chronic light exposure and uveal melanoma: a meta-analysis. **Ophthalmology** 2005; 112:1599-617.

Shen MM, Abate-Shen C. Pten inactivation and the emergence of androgen – independent prostate cancer. **Cancer Res** 2007; 67:6535-8.

Shields CL, Furuta M, Thangappan A, et al. Metastases of uveal melanoma millimeter-by millimeter in 8033 consecutive eyes. **Arch Ophthalmol** 2009; 127:989-98.

Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. **Exp Cell Res** 2001; 264:29-41.

Singh AD, Topham A. Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973-1997. **Ophthalmology** 2003; 110:956-61.

Singh AD, Terman S, Sculley L. Estimating choroidal melanoma volume: comparison of methods. **Ophthalmology** 2007; 114:1212-4.

Singh AD, Turell ME, Topham AK. Uveal Melanoma: trends in incidence, treatment and survival. **Ophthalmology** 2011; 118:1881-5.

Sisley K, Rennie GI, Cottam DW, Potter AM, Potter CW, Rees RC. Cytogenetic findings in six posterior uveal melanomas: involvement of chromosomes 3,6 and 8. **Genes Chromos Cancer** 1990; 2:205-9.

Sisley K, Doherty R, Cross NA. What hope for the future? GNAQ and uveal melanoma. **Br J Ophthalmol** 2011; 95:620-3.

Slipicevic A, Holm R, Nguyen MT, Bohler PJ, Davidson B, Florenes VA. Expression of activated Akt and PTEN with clinical outcome in malignant melanomas: relationship with clinical outcome. **Am J Clin Pathol** 2005; 124:528-36.

Spendlove HE, Damato BE, Humphreys J, Barker KT, Hiscott PS, Houslton RS. BRAF mutations are detectable in conjunctival but not uveal melanomas. **Melanoma Res** 2004; 14:449-52.

Stahl JM, Sharma A, Cheung M, et al. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. **Cancer Res** 2004; 64:7002-10.

Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK/ and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. **Aging (Albany NY)** 2011; 3:192-222.

Vajdic CM, Kricker A, Giblin M, et al. Sun exposure predicts risk of ocular melanoma in Australia. **Int J Cancer** 2002; 101:175-82.

Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. **Nature** 2009; 457:599-602.

Veenhuizen KCW, de Witt PEJ, Mooi WJ, Scheffer E, Verbeek ALM, Ruiter DJ. Quality assessment by expert opinion in melanoma pathology: Experience of the pathology panel of the Dutch Melanoma Working Party. **J Pathol** 1997; 182:266-72.

Virgili G, Gatta G, Ciccolallo L, et al. Incidence of uveal melanoma in Europe. **Ophthalmology** 2007; 114:2309-15.

Virgili GV, Gatta G, Ciccolallo L, et al. Survival in patients with uveal melanoma in Europe. **Arch Ophthalmol** 2008; 126:1413-8.

Wang X, Trotman L, Koppie T, et al. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. **Cell** 2007; 128:129-39.

Wong CW, Fan YS, Chan TL, et al. BRAF and NRAS mutations are uncommon in melanomas arising in diverse internal organs. **J Clin Pathol** 2005; 58:640-4.

Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. **Oncogene** 2003; 22:3113-9.

Xie P, Williams DS, Atilla-Gokcumen GE, et al. Structure-based design of an organoruthenium phosphatidyl-inositol-3-kinase inhibitor reveals a switch governing lipid kinase potency and selectivity. **ACS Chem Biol** 2008; 3:305-16.

Yang N, Kaur S, Volinia S, et al. Micro RNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer. **Cancer Res** 2008; 68:10307-14.

Ye M, Hu D, Tu L, et al. Involvement of PI3K/Akt signaling pathway in Hepatocyte growth factor-induced migration of uveal melanoma cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2008; 49:497-504.

Zimmerman LE, McLean IW, Foster WD. Does enucleation of the eye containing a malignant melanoma prevent or accelerate the dissemination of tumor cells. **Br J Ophthalmol** 1978; 62:420-5.

Zipfel PA, Brady DC, Kashatus DF, Ancrile BD, Tyler DS, Counter CM. Ral activation promotes melanomagenesis. **Oncogene** 2010; 29:4859-64.

Zuidervaart W, van Nieuwpoort F, Stark M, et al. Activation of the MAPK pathway is a common event in uveal melanomas although it rarely occurs through mutation of BRAF or RAS. **Br J Cancer** 2005; 92:2032-8.