

**ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE
CICLINA D1, CDK4, CICLINA E, CDK2 E ESTUDO DA
HIBRIDIZAÇÃO “IN SITU” POR FLUORESCÊNCIA PARA
CICLINA D1 EM MELANOMA CUTÂNEO PRIMÁRIO DE
PACIENTES SUBMETIDOS À PESQUISA DE LINFONODO
SENTINELA**

CRISTIANO LUIZ HORTA DE LIMA JUNIOR

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de contração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Isabela Werneck da Cunha
Co-orientador: Dr. Clovis Antonio Lopes Pinto**

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Lima Junior, Cristiano Luiz Horta de

Estudo da expressão imuno-histoquímica de ciclina D1, CDK4, ciclina E, CDK2 e estudo da hibridização “in situ” por fluorescência para ciclina D1 em melanoma cutâneo primário de pacientes submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela / Cristiano Luiz Horta de Lima Junior – São Paulo, 2017.

71p.

Tese (doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Isabela Werneck da Cunha

Descritores: 1. Melanoma/Melanoma. 2. Biópsia de Linfonodo Sentinela/Sentinel Lymph Node Biopsy. 3. Imuno-histoquímica/Immunohistochemistry. 4. Ciclina D1/Cyclin D1. 5. Quinases Ciclina-Dependentes/Cyclin-Dependent Kinases. 6. Ciclina E/Cyclin E. 7. Hibridização *In Situ* Fluorescente/In Situ Hybridization, Fluorescence. 8. Análise Serial de Tecidos/Tissue Array Analysis.

*Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades
para a sua própria produção ou a sua construção.*

Paulo Freire

DEDICATÓRIA

Aos pacientes que inconscientemente nos ajudam a nos tornar pessoas melhores e, mesmo sem saber, contribuem com a ciência na busca constante do conhecimento para que possamos, enfim, amenizar a dor do próximo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais *Rosa Aguiar Horta de Lima* e *Christiano Luiz Horta de Lima* por tudo que fizeram e continuam fazendo por seus filhos sem se importar com o passar do tempo e a saúde tornando a vida mais suave para os seus e aos que estão ao seu redor. Deus vos abençoe e que a Paz esteja em vossos corações. Amo vocês.

Aos meus irmãos *Paulo Eduardo Horta de Lima*, *Luiz Soares Horta de Lima*, *Marcos Roberto Horta de Lima* e *Juliana Aguiar Horta de Lima* que compreendem sem entender a minha ausência e fazem dos momentos em família algo tão inesquecível cuja lembrança me faz mantê-los sempre vivos em meu coração. Obrigado por existirem.

À minha família linda, minha esposa *Flavia Silva Horta de Lima* que me ensinou o verdadeiro significado do Amor Incondicional e que me deu o meu maior tesouro, meus filhos, *Vitor Horta de Lima e Silva* e *Laura Horta de Lima e Silva*, cuja vitalidade e saúde me fazem interromper minhas atividades mostrando que a vida deve ser um constante equilíbrio entre o trabalho e o lazer. Obrigado por entenderem que às vezes tenho de me ausentar um pouco. “É para uma boa causa”. Beijo no coração de vocês.

Aos meus queridos Onildo Alves da Silva e Darlene Luzia Pereira Silva, meus sogros que compreenderam minha ausência, apoiando-me sempre nesta jornada, mas sempre me tentando a interromper meus estudos em troca da deliciosa companhia, sossego e carinho que encontro em Goiânia, contando com a ajuda incansável do Emilio, Alessandro, Luciene, Adriana e meus sobrinhos Enzo, Breno, Lais, Pedro e Tiago. Obrigado por tudo. Abraços distantes.

À *Dra. Helena Müller* pelos ensinamentos e exemplo de dedicação e força de vontade, ensinando-me que nunca é tarde para aprender. Que Deus te abençoe com muita saúde e Coragem. Beijinhos.

À minha amiga *Rosângela Paulino de Brito de Souza* que mesmo sem saber me ajuda a superar as dificuldades e me orienta em como seguir em frente com Fé, Sabedoria e Coragem. Muito obrigado.

À *Dra. Isabela Werneck da Cunha* por acreditar neste projeto e me ajudar a seguir em frente mesmo diante das mais variadas diversidades da vida. Agradeço de coração não somente os ensinamentos e orientações, mas o apoio e incentivo, além da compreensão que supera a generosidade. Espero seguir em frente juntos.

Ao *Dr. Clovis Antonio Lopes Pinto* por embarcar nesta empreitada, confiando a mim a realização deste projeto.

Ao *Prof. Dr. Fernando Augusto Soares*, chefe do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center agradeço como admirador pela oportunidade de utilizar de forma irrestrita todos os recursos disponíveis em seu departamento.

Aos queridos mestres Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto, Prof. Dr. Francisco Aparecido Belfort, Prof. Dr. Luiz Rodolpho Raja Gabaglia, Profa. Dra. Mariana Petaccia de Macedo e Profa Dra Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osório pelos ensinamentos e pela correção do meu trabalho. Um grande abraço com admiração do eterno aluno.

Aos *Pacientes* que participaram deste projeto e a todos os demais que diariamente me incentivam a melhorar para que diante das dificuldades impostas pela doença eu possa de alguma forma confortá-los e acolhê-los amenizando suas dores.

Ao *Dr. Gilles Landman* pelos ensinamentos que me trouxeram até aqui.

A todos do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center por terem me auxiliado e me acolhido sem restrições.

Aos funcionários do arquivo de blocos do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center por todo trabalho realizado neste projeto.

Ao Sr. *Carlos Eugênio Nascimento Braga*, funcionário do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, pelo excelente trabalho na confecção do *tissue microarray*.

Ao biólogo *José Ivanildo Neves e Simone Cristiane Pagoti* por ter realizado todas as reações, sempre com gentileza e boa vontade.

A todos da Pós Graduação, em especial, às *Srta. Ana Maria Rodrigues, Srta. Luciana Costa Pitombeira e Srta. Vanuza Barros*, por toda ajuda, incentivo, apoio e compreensão que foram indispensáveis durante todo o tempo deste projeto. Obrigado de coração.

Ao Prof. Dr. *Vinicius Fernando Calsavara*, do Núcleo de Epidemiologia e Estatística, pela análise estatística do meu trabalho.

À *Suely Francisco*, Bibliotecária, e toda sua equipe pela incansável paciência e bom humor que me ajudaram tanto nesta jornada. Espero ter aprendido seus ensinamentos que me auxiliam nesta vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. *João Pedreira Duprat Neto* e aos colegas do Núcleo de Câncer de Pele e Dermatologia do A.C.Camargo Cancer Center, pelo incentivo, conselhos e ajuda em todas as etapas desta empreitada.

Aos meus amigos que aceitaram a minha ausência, mas sempre estiveram por perto, prontos a ajudar e a compartilhar momentos tristes e alegres sem esperar nada em troca. Sigamos sempre juntos.

À querida amiga e professora de inglês *Sra. Venir Barcellos Coelho*, thank you teacher for everything you've taught to me. You know that I admire you and I

hope that we could be together in many others projects like this. God bless you.
Kisses

Aos colegas *Dra. Adriana Mendes, Dra. Estrela Dalva Daurea Machado, Dra. Mônica Aribi, Dra. Valeria Petri, Dra. Luiza Keiko*, e muitos outros que sabem que sou grato por sua sabedoria e exemplo que me incentivam a continuar nesta estrada.

Aos colegas, alunos, residentes e funcionários do Serviço de Dermatologia do Hospital Ipiranga pela paciência e tolerância durante estes anos todos. Obrigado por todo o incentivo.

Ao amigo *Fernando Silveira* que acredita em meu potencial e me incentiva a progredir e prosperar sem se importar com o amanhã. Um grande abraço carinhoso.

À Fundação Antônio Prudente, por permitir o meu aprimoramento profissional e acadêmico.

A Deus que me ouviu chama-lo tantas vezes, algumas em vão e outras tantas nem tanto. Como um bom filho tenho procurado não o importunar em vão. Abençoe este trabalho e a todos que se envolveram nele, em especial aos pacientes, alguns dos quais já estão em sua companhia. Obrigado. Amém.

RESUMO

Lima Junior CLH. **Estudo da expressão imunoistoquímica de ciclina D1, CDK4, ciclina e, CDK2 e estudo da hibridização “in situ” por fluorescência para ciclina D1 em melanoma cutâneo primário de pacientes submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela.** São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Introdução: O câncer de pele é o mais prevalente no Brasil e o melanoma cutâneo representa 3% deles. Devido ao seu comportamento, o melanoma pode ser considerado o tumor mais imprevisível. A característica mais temida do melanoma é a sua capacidade de disseminação (ou metástase) para outras partes do corpo. O interesse desta pesquisa é tentar melhorar o conhecimento sobre este tumor através da análise do melanoma cutâneo primário com e sem metástase no linfonodo sentinela. A biópsia do linfonodo sentinela (LNS) - o primeiro linfonodo a ser envolvido na disseminação linfática - pode prever o potencial de câncer na base nodal associada. O papel exato das proteínas relacionadas ao ciclo celular no melanoma permanece obscuro. A ciclina D1 e seu gene que parece ser importante no desenvolvimento, progressão e prognóstico no melanoma é controverso. **Objetivo:** analisar a expressão das proteínas do ciclo celular: ciclina D1, CDK4, Ciclina E e CDK2 no melanoma cutâneo primário de pacientes submetidos a biópsia de linfonodo sentinela por imunoistoquímica e avaliar o gene da ciclina D1 através de hibridização in situ fluorescente (FISH) na mesma população. **Paciente e Método:** Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo que utilizou amostras de melanoma cutâneo de pacientes atendidos no A.C.Camargo Cancer Center entre 1998 a 2008 e submetidos à biópsia de linfonodo sentinela. As amostras tumorais foram utilizadas em *Tissue microarray* (TMA) que foi utilizado para fornecer material para imuno-histoquímica e FISH. **Resultado:** Foram inscritos 157 indivíduos para este estudo. A idade média no diagnóstico foi de 53 anos e a faixa etária variou de 23 a 85 anos. As mulheres representaram 53,5% e 38,9% dos tumores foram localizados nos membros, seguidos do tronco (36,9%). O melanoma extensivo superficial foi o mais

prevalente nesta população (66,2%) seguido de melanoma acral lentiginoso (15,9%). 97,5% desses tumores estavam em fase de crescimento vertical. A espessura de Breslow acima de 1mm foi observada em 74,5% dos tumores. A índice mitótico do tumor primário variou de 0 (27 casos), 1 (29 casos) a mais de 1 (100 casos). Nenhum dos casos apresentou invasão vascular, mas a invasão linfática foi observada em 6 casos (3,8%) e se relacionou com metástase nodal igual à ulceração que foi observada em 55 casos (35%). A invasão perineural foi observada em 5 casos. As metástases no linfonodo sentinela foram detectadas em 28% (44 casos). A expressão da ciclina D1, CDK4, Ciclina E e CDK4 não apresentou relação estatística significativa com a espessura de Breslow, assim como metástases em LNS. A amplificação, o ganho e a polissomia do gene CCND1 foram observados em vinte casos e não apresentaram relação estatística significativa com a espessura de Breslow, assim como metástases em LNS. **Conclusão:** Este estudo mostra que o TMA é uma boa técnica para a análise de amostras tumorais para imunoistoquímica e FISH. Nenhuma das proteínas do ciclo celular estava relacionada ao mau prognóstico representado pela metástase do LNS. Alterações no gene CCND1 não foram relacionadas à metástase de melanoma em LNS. Certamente outros estudos devem ser feitos para complementar o conhecimento sobre o comportamento biológico dessas proteínas no melanoma cutâneo.

SUMMARY

Lima Junior CLH. [Study of the expression of cyclin D1, CDK4, cyclin E and, CDK2 by immunohistochemistry and study of fluorescent in situ hybridization (FISH) for cyclin D1 in primary cutaneous melanoma of patients submitted to sentinel lymph node biopsy]. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Introduction: The skin cancer is the most prevalent cancer in Brazil and cutaneous melanoma represents 3% of them. Due its behavior melanoma can be considered the most unpredictable tumor. The most dangerous aspect of melanoma is its ability to spread (or metastasize) to other parts of the body. The interest of this research is to try to improve the knowledge about this tumor through the analyses of the primary cutaneous melanoma with and without metastasis in sentinel lymph node. Biopsy of the sentinel lymph node (SLN)-the first node to be involved in lymphatic spread-can predict the potential for cancer in the associated basin the exact role of proteins related to cell cycle in melanoma remains unclear. The Cyclin D1 and its gene that seems to be important in development, progression and prognosis in melanoma is controversial. **Objective:** the aim of this study is to analyse the expression of cell-cycle proteins: cyclin D1, CDK4, Cyclin E and CDK2 in primary cutaneous melanoma of patients that were submitted to sentinel lymph node biopsy through immunohistochemistry and evaluate the cyclin D1-gene through fluorescence in situ hybridization (FISH) in the same population. **Patient and Method:** This is a retrospective cohort study that used cutaneous melanoma samples of patients that were assisted in A.C.Camargo Cancer Center between 1998 to 2008 and submitted to sentinel lymph node biopsy. the tumor samples were used in the tissue microarray (TMA) that was used to provide material for immunohistochemistry and FISH. **Result:** 157 subjects were enrolled for this study. The mean age at diagnosis was 53 years and the age range was from 23 to 85 years-old. Women accounted for 53,5% and 38,9% of the tumors were located at the limbs followed by the trunk (36,9%). Superficial spreading melanoma was the most prevalent in this population (66,2%) followed by acral lentiginous melanoma (15,9%). 97,5% of those tumors were in vertical growth phase melanoma. Breslow thickness above 1mm was observed in 74,5% of the

tumors. The primary tumor mitotic rate ranged from 0 (27 cases), 1 (29 cases) to more than 1 (100 cases). None of case showed vascular invasion but lymphatic invasion was seen in 6 cases (3,8%) and it was related to nodal metastasis same as ulceration that was noticed in 55 cases (35%). Perineural invasion was observed in 5 cases. Metastases in the sentinel lymph node was detected in 28% (44 cases). The expression of cyclin D1, CDK4, Cyclin E and CDK4 didn't have a statistic significant relation to Breslow thickness as well as metastasis in SLN. CCND1 gene amplification, gain and polissomy was seen in 20 cases and didn't have a statistic significant relation to metastasis in SLN.

Conclusion: This study shows that TMA is a good technique for the analysis of tumor samples for immunohistochemistry and FISH. None of the cell-cycle proteins were related to poor prognosis represented by SLN metastasis. Alterations in CCND1-gene were not related to melanoma metastasis in SLN. Surely others studies should be done to complement the knowledge about the biological behaviour of those proteins in cutaneous melanoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição proporcional dos casos de melanoma cutâneo estimados para 2016 por gênero e região brasileira.....	1
Figura 2	Esquema demonstrando a participação dos complexos CDK/ciclina em todas as fases do ciclo celular.....	14
Figura 3	Esquema demonstrando a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRB) pelo complexo CDK/ciclina, liberando o fator transcricional E2F necessário para sequência dos eventos de divisão celular.....	15
Figura 4	Esquema do ciclo celular indicando proteínas inibidoras dos complexos CDK/ciclina na fase G1 do ciclo celular.....	16
Figura 5	Estudo imunoistoquímico para ciclina D1 nas células de melanoma cutâneo.....	33
Figura 6	Estudo imunoistoquímico para CDK 4 nas células de melanoma cutâneo.....	34
Figura 7	Estudo imunoistoquímico para CDK4 nas células de melanoma cutâneo com expressão negativa.....	35
Figura 8	Estudo imunoistoquímico para CDK4 nas células de melanoma cutâneo com expressão positiva.....	36
Figura 9	Estudo imunoistoquímico para ciclina E nas células de melanoma cutâneo.....	39

Figura 10	Estudo imunoistoquímico para CDK2 nas células de melanoma cutâneo.....	41
Figura 11	Gráfico da expressão do gene CCND1 por FISH e expressão de ciclina D1 por imuno-histoquímica. (A.C.Camargo Cancer Center 1998-2008).....	47

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Classificação das categorias de T (tamanho da lesão primária) segundo a 8ª Edição AJCC – 2017.....	7
Quadro 2	Classificação das categorias de N (metástase loco-regional linfonodal e/ou extralinfonodal) segundo a 8ª Edição AJCC – 2017.....	8
Quadro 3	Classificação das categorias de M (metástase) segundo a 8ª Edição AJCC – 2017.....	9
Quadro 4	Estadiamento clínico (cTNM) segundo a 8ª Edição AJCC – 2017.....	10
Tabela 1	Número e porcentagem de pacientes segundo as variáveis demográficas e clínicas. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).....	29
Tabela 2	Número e porcentagem de pacientes segundo as variáveis histopatológicas estudadas. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).....	31
Tabela 3	Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de ciclina D1. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).....	32
Tabela 4	Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de CDK4. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).....	37

Tabela 5	Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de Ciclina E. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).....	37
Tabela 6	Número e porcentagem de pacientes segundo a marcação nuclear de Ciclina D1 e Ciclina E (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).....	38
Tabela 7	Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de CDK2. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).....	40
Tabela 8	Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise de FISH. (A.C.Camargo Cancer Center 1998-2008).....	42
Tabela 9	Número e porcentagem de pacientes segundo o status para micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e as variáveis demográficas e clínicas estudadas. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).....	43
Tabela 10	Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e as variáveis histopatológicas estudadas. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).....	44
Tabela 11	Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de ciclina D1. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).....	45

Tabela 12	Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de CDK4. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008)....	45
Tabela 13	Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de ciclina E. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).....	45
Tabela 14	Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de micrometástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de CDK 2. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).....	46
Tabela 15	Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de metástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão do gene CCND1 por FISH. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).....	46
Tabela 16	Número e porcentagem de pacientes com melanoma acral segundo a presença de metástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão do gene CCND1 por FISH. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CAK	Quinase ativadora de CDK (do inglês CDK-activating kinase)
CCND1	Gene responsável pela codificação da proteína Ciclina D1
CDK	Quinase dependente de Ciclina (do inglês <i>Cyclin-dependent Kinase</i>)
CGA	Campos de grande aumento
DHL	Desidrogenase Láctica
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês deoxiribonucleic acid)
FISH	Hibridização “in situ” Fluorescente (do inglês Fluorescent In Situ Hybridization)
H&E	Hematoxilina e Eosina
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LN	Linfonodo
LNS	Linfonodo sentinela
mRNA	Ácido ribonucleico (RNA) mensageiro
MSAT	Micro satélite
MT	Metástase em trânsito
pRb	Proteína do retinoblastoma
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
SAT	Satelitose
SNC	Sistema Nervoso Central
TMA	<i>tissue microarray</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O Linfonodo Sentinela	10
1.2	Desenvolvimento do Câncer – Melanoma	12
1.3	O Ciclo Celular	13
2	OBJETIVOS.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	Comitê de Ética em Pesquisa	20
3.2	Descrição do Estudo.....	20
3.3	Revisão dos Prontuários	21
3.4	CrITÉrios de Inclusão.....	21
3.5	Banco de Dados.....	22
3.6	Método	22
3.6.1	Construção e análise do tissue microarray (TMA).....	22
3.6.2	Confecção das lâminas de vidro.....	23
3.6.3	Estudo Imuno-histoquímico	23
3.6.4	Estudo de Hibridização “in situ” por fluorescência (FISH	23
3.6.5	Protocolo de reações	23
3.6.6	Leitura das lâminas	26
3.6.7	Análise estatística.....	28
4	RESULTADOS.....	29
4.1	Descrição das Características Sociodemográficas e Clínicas.....	29
4.2	Descrição das Características Histopatológicas	30
4.3	Expressão Proteica por Imuno-histoquímica.....	31
4.3.1	Ciclina D1	31
4.3.2	CDK4	34
4.3.3	Ciclina E.....	37
4.3.4	CDK2	40
4.3.5	FISH	42
4.4	Variáveis associadas à presença de metástase em LNS	42

4.4.1	Análise univariada.....	42
5	DISCUSSÃO	48
5.1	CICLINA D1	52
5.2	CDK 4	58
5.3	CICLINA E	60
5.4	CDK2	62
6	CONCLUSÕES	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é uma neoplasia que mantém sua incidência crescente em todo o mundo, sendo a de maior aumento anual nas populações de pele clara (MACKIE et al. 2002; KATALINIC et al. 2002; GERBAUD et al. 2003; ARMSTRONG 2004).

No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) revelam que para o ano de 2016 foram estimados 5.670 novos casos, sendo 3.000 homens e 2.670 mulheres (Ministério da Saúde 2016). Esses valores correspondem a um risco estimado de 3,03 casos novos a cada 100 mil homens e 2,59 para cada 100 mil mulheres. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sudeste e Sul do Brasil (Figura 1). O número de mortes, em 2013, foi de 1.547, sendo 903 homens e 644 mulheres (2013 - Sistema de Informações sobre Mortalidade - INCA).

Região	Casos	%	Homens	Mulheres	Casos	%	Região
sudeste	1160	20,46			1100	19,40	sudeste
sul	990	17,46			960	16,93	sul
nordeste	550	9,70			390	6,88	nordeste
centro oeste	210	3,70			150	2,65	centro oeste
norte	90	1,59			70	1,23	norte
Total	3000	52,91			2670	47,09	Total

Fonte: Ministério da Saúde (2016)

Figura 1 - Distribuição proporcional dos casos de melanoma cutâneo estimados para 2016 por gênero e região brasileira.

Os melanócitos são células encontradas ao longo da camada basal da epiderme cuja principal função é a produção do pigmento melanina que confere o tom castanho à pele conferindo fotoproteção natural (GREEN e KHAVARI 2004; RIZOS et al. 2004). Também atuam como células sensoriais e regulatórias através da indução de respostas neuroendócrinas e imunomodulatórias, participando, deste modo, da manutenção da homeostase cutânea (SLOMINSKI et al. 1998). Os melanócitos, em indivíduos adultos, estão normalmente quiescentes e podem apresentar atividade mitótica discreta frente a estímulos externos específicos como radiação ultravioleta e cicatrização (SLOMINSKI et al. 1998; RIZOS et al. 2004). Esta atividade proliferativa requer controle do ciclo celular e, alterações em seus sinais regulatórios podem resultar em divisão celular não controlada, podendo representar o início do processo de transformação maligna (RIZOS et al. 2004).

O melanoma cutâneo origina-se da transformação maligna dos melanócitos epidérmicos. Este processo é provavelmente multifatorial e resulta de interações complexas entre fatores genéticos, constitucionais e ambientais (ALBINO et al. 1997; SLOMINSKI et al. 2001).

Segundo o Consenso de relatório histopatológico proposto pelo Grupo Brasileiro de Melanoma estão incluídos os seguintes critérios (LANDMAN et al. 2003):

- a. **Tipo histológico:** foram considerados neste estudo: lentigo maligno melanoma, melanoma extensivo superficial, melanoma acral lentiginoso, melanoma nodular e outros (melanoma desmoplásico, neurotrópico, nevóide, spitzóide e verrucoso.). Sabe-se que a fase *in situ* do melanoma tem períodos variáveis de evolução para fase infiltrativa, sendo muita longa no lentigo

maligno melanoma e curta no extensivo superficial e acral lentiginoso. Na fase infiltrativa alguns tipos de melanoma parecem se comportar de forma mais agressiva como o melanoma nodular.

b. **Fase de crescimento:** são consideradas as fases de crescimento:

Radial: não tumorigênica; *in situ* e/ou microinvasiva, caracterizada por crescimento indolente, mas progressivo. As células melanocíticas na derme não apresentam mitoses, crescimento expansivo ou necrose e estão isoladas ou em pequenos grupamentos.

Vertical: invasiva, caracterizada por crescimento infiltrativo da derme, com alto grau de atipia nuclear, mitoses, invasão dos tecidos adjacentes e necrose.

Em lesões pouco espessas utiliza-se três critérios: a) tecas dérmicas maiores que os epidérmicos; b) qualquer mitose dérmica; c) tecas de qualquer tamanho com crescimento expansivo nítido, comprimindo a derme adjacente.

Nível de Clark: determinado pelos cinco níveis definidos por Wallace Clark (CLARK et al. 1969). São eles:

Nível I: limitação das células de melanoma à epiderme e seus apêndices.

Nível II: extensão à derme papilar com poucas células de melanoma estendendo-se à interface entre a derme papilar e a reticular.

Nível III: extensão das células tumorais por toda a derme papilar sem invadir a derme reticular

Nível IV: invasão da derme reticular.

Nível V: invasão da tela subcutânea.

c. **Profundidade segundo Breslow:** estabelecida por Alexander Breslow em 1970 refere-se à medida objetiva em milímetros entre o topo da camada

granulosa e a extensão mais profunda do tumor. Nos casos de ulceração a medida é feita entre a base da úlcera e o ponto mais profundo de invasão (BRESLOW 1970).

- d. **Índice mitótico:** avaliado em lesões em fase vertical de crescimento, na área de maior concentração de mitoses, e, equivale a quantidade de mitoses em aproximadamente 1mm^2 .
- e. **Infiltrado linfocitário intratumoral:** infiltrado de linfócitos entre as células tumorais na base do tumor, permeando as células neoplásicas, formando “rosetas” ao redor de células tumorais e apresentando evidências histológicas de degeneração das células neoplásicas.
- f. **Infiltrado linfocitário peritumoral:** infiltrado de linfócitos ao redor da área tumoral.
- g. **Invasões angio-linfática e perineural:** células neoplásicas no interior de vasos sanguíneos e linfáticos e, invasão do perineuro de filetes nervosos.
- h. **Ulceração:** definida como solução de continuidade da epiderme, substituída por tampão fibrino-leucocitário sobre a área tumoral. Erosões parciais e sítios de biópsia anterior não configuram ulceração. Considerada como fator de alto risco de metástase. O índice de sobrevida de pacientes com melanoma ulcerado é proporcionalmente menor que aquele de pacientes com melanoma não ulcerado da mesma categoria T, equivalendo-se ao índice de sobrevida de pacientes com melanoma não ulcerado de uma categoria T acima (BALCH et al. 2001)
- i. **Regressão:** área do tumor onde se observa tecido fibroso cicatricial, na ausência de biópsia prévia, e aumento da vascularização com ou sem

linfócitos e melanófagos, além da ausência de células neoplásicas na epiderme e na derme. As opiniões entre os autores são controversas em relação à associação entre regressão e pior prognóstico do tumor (BLESSING et al. 1990).

- j. **Satelitose:** define-se lesão satélite (SAT) qualquer tumor grosseiramente visível até 2 cm do tumor primário. **Satelitose microscópica ou microsatélite (MSAT):** é representada por metástase microscópica cutânea (dérmica ou subcutânea), caracterizada pela presença de um foco descontínuo do tumor primário na ausência de fibrose ou inflamação que poderia representar área de regressão, independente de tamanho ou distância mínima do tumor primário.
- k. **Margem cirúrgica:** A abordagem cirúrgica para o melanoma cutâneo é feita em duas etapas. A primeira consiste em uma excisão completa com 1-2mm de margem (biópsia excisional) para se estabelecer o diagnóstico e obter o microestadiamento através das variáveis histológicas descritas acima. O segundo passo se refere a ampliação das margens e pesquisa de linfonodo sentinela quando indicada. (WAINSTEIN et al. 2004).

Os critérios para o estadiamento do melanoma cutâneo definidos pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, que se tornaram oficial em 2002 na sexta edição do manual de estadiamento de câncer foi revisada e publicada em 2009, na sétima edição do *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* e implementada em janeiro de 2010. Em 2017 a oitava edição foi publicada avaliando-se novas recomendações e mudanças através da Medicina Baseada em Evidências e Estatísticas incorporando-as formalmente (EDGE et al. 2010).

A espessura do melanoma primário e ulceração do tumor continuam a definir os estratos da categoria T (tumor), porém novas subcategorias de T1 foram criadas com base na espessura de 0,8mm (Quadro 1) e não se utiliza mais presença de mitoses em melanomas com menos de 1 mm de espessura. Na edição anterior (sétima edição) o índice mitótico do tumor primário (histologicamente definida como o número de mitoses / mm²) foi considerado um fator preditor desfavorável, independente, de sobrevida e, em melanomas T1, a presença de pelo menos uma mitose/mm² classificava o tumor na subcategoria T1b. A presença de ulceração do tumor primário continua a ser um preditor desfavorável de sobrevida, considerado um critério primário para a definição de melanomas T1b.

Quadro 1 - Classificação das categorias de T (tamanho da lesão primária) segundo a 8ª Edição AJCC – 2017

Categoria T	Espessura		Ulceração
Tx: espessura tumoral não pode ser acessada (ex: curetagem)	Não se aplica		Não se aplica
T0: não há evidência de tumor (ex: primário desconhecido ou regressão total do primário)	Não se aplica		Não se aplica
Tis (melanoma in situ)	Não se aplica		Não se aplica
T1	≤ 1mm		Desconhecido ou não especificado
	T1a	<0,8 mm	Sem ulceração
	T1b	<0,8 mm	Com ulceração
		0,8-1,0 mm	Com ou sem ulceração
T2	>1,0-2,0mm		Desconhecido ou não especificado
	T2a	>1,0-2,0mm	Sem ulceração
	T2b	>1,0-2,0mm	Com ulceração
T3	>2,0-4,0mm		Desconhecido ou não especificado
	T3a	>2,0-4,0mm	Sem ulceração
	T3b	>2,0-4,0mm	Com ulceração
T4	>4,0mm		Desconhecido ou não especificado
	T4a	>4,0mm	Sem ulceração
	T4b	>4,0mm	Com ulceração

Fonte: EDGE et al. (2010)

Metástase nodal detectável clinicamente ou por imagem é definida como macrometástase ou metástase macroscópica em melanoma cutâneo, termo que deve ser substituído por “clinicamente detectado”. O termo micrometástase ou metástase microscópica em linfonodo em melanoma cutâneo é a que está presente em linfonodos não detectados clinicamente ou por imagem. Estes termos devem ser substituídos por “clinicamente oculto”. Pode ser definida utilizando-se a técnica de hematoxilina e eosina (H & E) ou a técnica de imuno-histoquímica (anteriormente,

apenas o H & E poderia ser utilizado para fins de teste formais). Não há limite inferior de carga tumoral usada para definir a presença de metástase nodal regional, e depósitos tumorais nodais de qualquer tamanho devem ser incluídos no estadiamento da doença nodal. A recomendação atual é descrever a maior dimensão (em milímetros) do maior foco encontrado no linfonodo, que embora não seja usado para definir subcategorias (N) é considerado fator prognóstico de doença regional. Doença regional não nodal (lesão satélite, microssatélite e metástase em trânsito (MT), definida como sendo tumor clinicamente evidente, dérmico ou subcutâneo, a partir de 2,0 cm do tumor primário em direção ou não ao primeiro foco de drenagem linfática) está estratificada pela categoria N, de acordo com o número de linfonodos envolvidos pelo tumor (Quadro 2).

Quadro 2 - Classificação das categorias de N (metástase loco-regional linfonodal e/ou extralinfonodal) segundo a 8ª Edição AJCC – 2017

Categoria N	Número de linfonodos positivos		Presença de SAT, MSAT ou MT
NX	Não avaliado		Não
N0	Linfonodo negativo		Não
N1	N1a	pN1(sn)*	Não
	N1b	pN1	Não
	N1c	Linfonodo negativo	Sim
N2	N2a	pN2(sn)	Não
	N2b	pN2	Não
	N2c	pN1(sn) ou Pn1	Sim
N3	N3a	pN4(sn) ou mais	Não
	N3b	pN4 ou LN coalescente	Não
	N3c	pN2(sn) e/ou pN2 e/ou qualquer LN coalescente	Sim
* LN positivo diagnosticado por técnica de LNS, completando-se a técnica de linfadenectomia (p).			

Fonte: EDGE et al. (2010)

Na sétima edição do estadiamento TNM definido pela AJCC (2009) a categoria M (metástase) tinha seus estratos definidos pelo(s) sítio(s) de metástases distantes: não visceral (ou seja, a pele / tecido mole / nodal distante) (M1a); pulmonar (M1b); e todos os outros sítios metastáticos viscerais e pacientes que apresentavam nível sérico elevado de desidrogenase láctica (DHL), independente do sítio da doença (M1c). Na 8ª edição (2017) a doença metastática passa a ter quatro categorias: M1a e M1b, permanecem inalteradas; M1c deixa de incluir metástase cerebral que configura, então, a categoria M1d. O nível de DHL deixou de definir uma categoria e passa a compor a codificação com um item extra: com sufixo (0) normal ou (1) alterado (Quadro 3).

Quadro 3 - Classificação das categorias de M (metátase) segundo a 8ª Edição AJCC – 2017

Categoria M		Sítio anatômico	Nível de DHL
M0		Sem evidências de metástase	Não se aplica
M1			
M1a	M1a(0)	Metástase para pele, tecidos moles, músculo ou LN não regionais	Não elevado
	M1a(1)		Elevado
M1b	M1b(0)	Metástase para pulmão com ou sem comprometimento dos sítios de M1a	Não elevado
	M1b(1)		Elevado
M1c	M1c(0)	Metástase para outros órgãos sem comprometimento de SNC com ou sem comprometimento dos sítios de M1a e M1b	Não elevado
	M1c(1)		Elevado
M1d	M1d(0)	Metástase para SNC com ou sem comprometimento dos sítios de M1a, M1b ou M1c	Não elevado
	M1d(1)		Elevado

Fonte: EDGE et al. (2010)

O mapeamento linfático e a biópsia de linfonodo sentinela continuam a ser componentes importantes do estadiamento do melanoma e deve ser usada (ou

discutida com o paciente) para identificar fase oculta III da doença nodal regional entre os pacientes que se apresentam com estágio clínico IB ou II (Quadro 4).

Quadro 4 - Estadiamento clínico (cTNM) segundo a 8ª Edição AJCC – 2017

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b ou T2a	N0	M0
IIA	T2b ou T3a	N0	M0
IIB	T3b ou T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
III	Qualquer T	>N1	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: EDGE et al. (2010)

1.1 O LINFONODO SENTINELA

A rotina de identificação e remoção de linfonodos regionais em neoplasias sólidas é essencial para o estadiamento preciso, avaliação de prognóstico e determinação de terapias adjuvantes. Por mais de 100 anos, a linfadenectomia radical tem sido o padrão ouro diagnóstico e terapêutico para o manejo da doença metastática nodal, apesar de morbidades bem conhecidas, como linfedema e lesão neural. Nas últimas décadas houve aumento na frequência de detecção de tumores sólidos nos estágios iniciais da doença. A maioria dos pacientes sem metástases nodais não se beneficia da remoção completa dos linfonodos regionais. A pesquisa do linfonodo sentinela (LNS) foi desenvolvida como uma modalidade para o estadiamento nodal preciso de tumores sólidos, poupando muitos pacientes das morbidades associadas com linfadenectomia radical. (SAHA et al. 2004).

A primeira descrição de que o primeiro linfonodo de drenagem de determinado seguimento, o linfonodo sentinela, surgiu na década de sessenta. Em seu estudo em câncer de pênis CABANAS (1977) descreveu pela primeira vez a importância fisiológica deste linfonodo, postulando que se o linfonodo sentinela fosse negativo para metástases os demais linfonodos da região poderiam ser poupados (CABANAS 1977; JAKUB et al. 2003).

MORTON et al. (1992) tornou evidente o valor do linfonodo sentinela em melanoma através de seu trabalho pioneiro, determinando que o linfonodo sentinela, poderia prever o estado dos linfonodos regionais com 99% de acurácia. A partir de 1990 técnicas de mapeamento do linfonodo sentinela com corantes ou radiofármacos (Tecnécio 99 radioativo) por estudo cintilográfico começou ser bem estabelecida (YUDD et al. 1999; MCMASTERS et al. 1999).

No A.C.Camargo Cancer Center (São Paulo) a pesquisa sistemática do linfonodo sentinela em melanoma cutâneo teve início em 1997. No primeiro ano foi indicada para melanomas com espessura de Breslow maior que 0,75 mm ou Nível de Clark igual a IV. A partir do ano seguinte foi indicada para os casos com espessura tumoral maior que 1,0 mm e, aqueles, com menos de 1,0 mm que apresentaram regressão, ulceração ou Clark IV ou V. O procedimento foi realizado no período de três meses após a abordagem inicial. Injeção de solução de Dextran com tecnécio-99 (Tc99) foi realizada um dia antes na proximidade da cicatriz ou ao redor da lesão primária. A localização do linfonodo sentinela foi definida e marcada com caneta utilizada em radioterapia. Momentos antes da cirurgia, o corante vital Azul Patente foi injetado e o sítio de injeção, massageado. Um captador manual de raios gama foi utilizado para identificar o linfonodo que apresentava a maior contagem radioativa,

sendo que este ao mesmo tempo apresenta-se em azul ou verde no intra-operatório. Realizada a excisão e fixação em solução de formalina 10% tamponada.

A análise de 240 casos consecutivos realizada por DUPRAT et al. (2005) verificou que a presença de metástase de melanoma cutâneo em linfonodo sentinela ocorreu em 17,5% utilizando-se associação das técnicas de rotina (hematoxilina e eosina) e imunoistoquímica (proteína S100, HMB45 e Melan A).

1.2 DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER – MELANOMA

Desregulação do ciclo celular e crescimento celular descontrolado são considerados pré-requisitos básicos para o desenvolvimento do câncer. O risco individual de melanoma depende basicamente de dois grupos de fatores: características individuais e peculiaridades ambientais. Dentre os fatores de risco potenciais estão exposição solar, número de episódios de queimadura solar, a cor da pele, cabelos e olhos, presença de efélides, número de nevos, uso de protetor solar ou proteção física, dentre outros (BAKOS et al. 2002; BATAILLE 2003).

O melanoma é uma neoplasia que permite estudo de eventos celulares relevantes para a transformação maligna, pois sua história natural mostra estágios progressivos de agressividade do tumor, de acordo com sua capacidade de infiltrar a derme (PARMITER e NOWELL 1993; SU et al. 1995; REED et al. 1995; ROBERTSON et al. 1996; ALBINO et al. 1997; KIM et al. 2002). Assim como na maioria das neoplasias malignas é resultante do rompimento da integridade do genoma dos melanócitos que induz instabilidade sustentada, produzida por alterações

cromossômicas, que irão determinar as características neoplásicas destas células (PARMITER e NOWELL 1993; ROBERTSON et al. 1996; ALBINO et al. 1997).

Numerosos são os estudos em busca de anormalidades cromossômicas relacionadas ao melanoma, muitas das quais envolvendo *loci gênico* relacionados a fatores de proliferação ou de apoptose, já que alterações na expressão ou atividade das proteínas que regulam o ciclo celular determinam o aparecimento e a capacidade de produzir metástases das neoplasias (KIM et al. 2002; RANE et al. 2002; BURY e CROSS 2003).

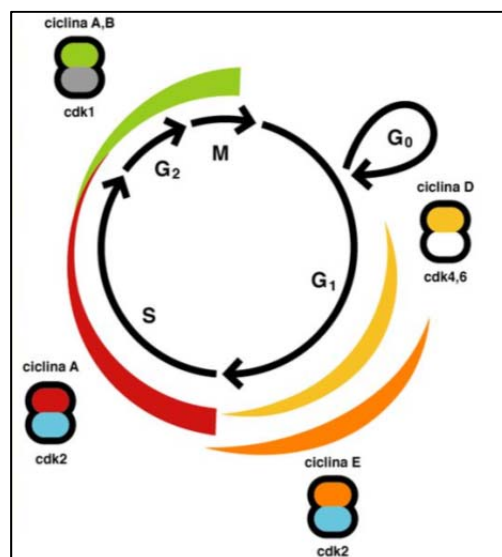
1.3 O CICLO CELULAR

O ciclo celular apresenta duas fases funcionais: fase S (síntese) onde ocorre a duplicação do ácido desoxiribonucleico (DNA) e fase M (mitose) onde ocorre a separação de duas células filhas; e duas fases preparatórias: G1 (“Gap” 1 ou intervalo 1) que antecede a fase S (síntese) e G2 (“Gap” 2 ou intervalo 2), preparatória para mitose. A sequência dos eventos do ciclo celular é controlada por fatores extra e intracelulares (ALBERTS et al. 2002a).

Sinais que levam à divisão celular são controlados por mudanças na concentração e atividade de dois grupos de proteínas: as quinases dependentes de ciclinas (CDK) e as ciclinas, que se unem às CDK ativando-as. Complexos CDK/ciclinas fosforilam grande número de substratos protéicos envolvidos na duplicação de DNA.

Em circunstâncias normais, o complexo CDK4/ciclina D e CDK6/ciclina D iniciam a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb) no início da fase G1

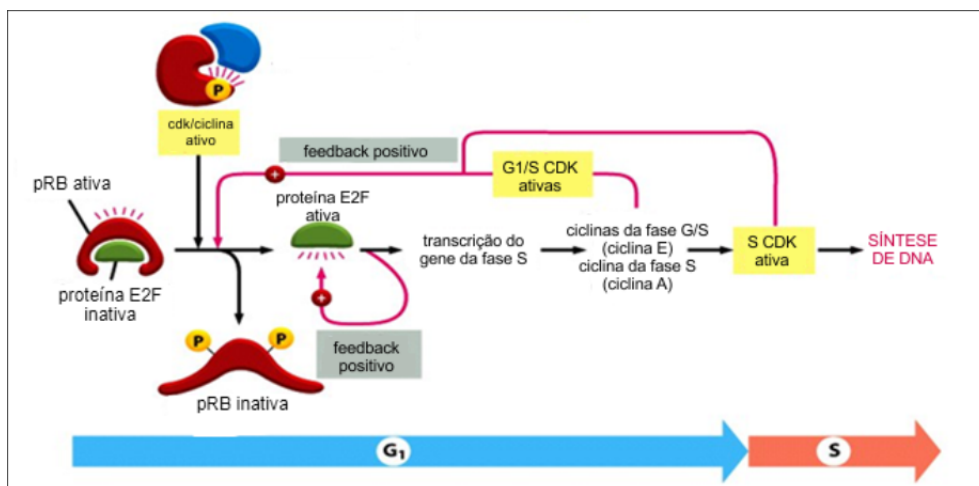
(SHERR e ROBERTS 1999). Isto conduz a liberação do fator de transcrição E2F resultando na ativação da transcrição de genes necessários para a progressão do ciclo celular (WEINBERG 1995). Na fase G1 tardia, o complexo CDK2/ciclina E completa a fosforilação da pRb que conduz a passagem através do ponto de restrição na fronteira da Fase G1/S, iniciando a fase S. Em seguida CDK2 desempenha um importante papel na progressão da fase S formando o complexo CDK2/ciclina A. Finalmente complexos CDK1/ciclina B participam ativamente para completar a mitose (RIABOWOL et al. 1989).



Fonte: Adaptado de CHAMMAS (2011).

Figura 2 - Esquema demonstrando a participação dos complexos CDK/ciclina em todas as fases do ciclo celular.

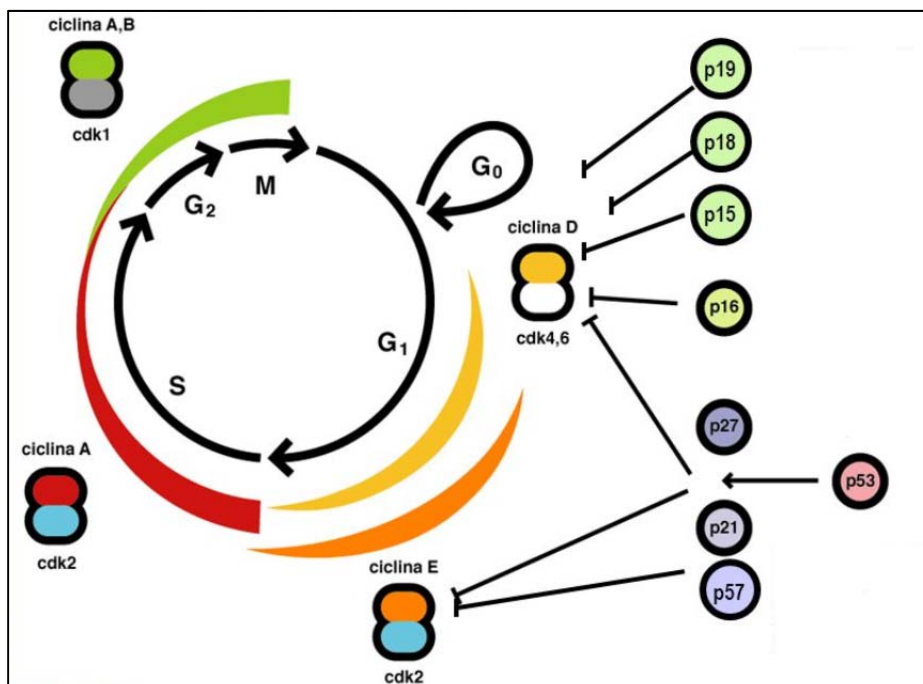
Sinais mitogênicos estimulam a célula aumentando a concentração intracelular de ciclina D e E. A ativação da ciclina D promove a fosforilação da proteína supressora de tumor retinoblastoma (pRb) que libera fatores transcricionais (E2F e c-abl) necessários para que a célula entre na fase S.



Fonte: Adaptado de <https://biocell4350.wickspaces.com/21.ciclocelular>

Figura 3 - Esquema demonstrando a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb) pelo complexo CDK/ciclina, liberando o fator transcricional E2F necessário para sequência dos eventos de divisão celular.

O princípio básico da regulação do ciclo celular é a iniciação da cascata de reações de fosforilação e defosforilação de proteínas específicas. Na fase G1 estas reações estão sujeitas ao controle da via pRb ou p53. A via pRb do ciclo celular inclui as seguintes proteínas: ciclina D1- D3, cdk4/cdk6 e p16(INK4a), p15(INK4b) e p18(INK4c) que são proteínas supressoras de tumor. Este grupo de proteínas evita a ativação do complexo CDK/ciclina pela CAK do DNA, promovendo a parada da célula em G1 por aumento da proteína p53. A permanência do ciclo celular na fase G1 também pode ocorrer com a participação de proteínas Cip/Kip como p21(Cip1), p27(Kip1) e p57(Kip2). Estas proteínas atuam ligando-se aos complexos ciclina D1/cdk4 e ciclina E/cdk2, levando a inativação destes complexos (CZAJKOWSKI et al. 2002, ALBERTS et al. 2002b).



Fonte: Adaptado de CHAMMAS (2011)

Figura 4 - Esquema do ciclo celular indicando proteínas inibidoras dos complexos CDK/ciclina na fase G1 do ciclo celular.

Ciclina D1 é codificada pelo gene CCN1 localizado no cromossomo 11q13 sendo considerado um importante oncogene. O papel da ciclina D1 no desenvolvimento, progressão e prognóstico do melanoma é controverso. Alguns estudos não mostraram diferenças na expressão de ciclina D1 em nevos e melanomas, enquanto que outros estudos mostraram super-expressão destas proteínas em melanomas do tipo acral (SAUTER et al. 2002). Nível elevado de ciclina D1 também foi encontrado em nevos melanocíticos displásicos e células de melanoma esporádico (CZAJKOWSKI et al. 2002). Expressão anormal de ciclina D1 tem se mostrado como sendo de pior prognóstico em melanomas uveais (RAMIREZ et al. 2005; SÁ 2005) evidenciou que melanomas infiltrativos tendem a perder a expressão de ciclina D1 quanto mais profundos ou em lesões metastáticas. Da mesma forma

LIMA JÚNIOR (2006) verificou diminuição da expressão de ciclina D1 em melanomas mais espessos.

Um dos elementos constituintes da via pRb do ciclo celular é o proto-oncogene CDK4. Codificado no gene localizado no cromossomo 12q13-14 encontra-se super-expresso em alguns casos de melanoma esporádico. Estudos moleculares têm mostrado a presença neste gene de mutações levando a troca de arginina por cisteína no códon 24 e de asparagina por serina no códon 41, provavelmente responsáveis por intensificação da expressão do gene CDK4. Em melanomas esta alteração torna a proteína resistente à inibição por p16 potencializando o seu papel como oncogene (BARTKOVA et al. 1996). A amplificação deste gene também é observada em câncer de mama e glioblastoma.

Ciclina E é codificada pelo gene CCNE1 localizado no cromossomo 19q13. A ciclina E é também uma proteína pertencente à família das ciclinas e une-se à quinase dependente de ciclina CDK2. O complexo formado (CDK2/CiclinaE) é capaz de fosforilar a proteína do retinoblastoma, liberando o fator transcricional E2F permitindo a célula seguir na fase S. A sobre-expressão deste gene tem sido observada em muitos tumores, sugerindo sua participação na instabilidade do cromossoma, e, portanto, contribuindo para a tumorigênese. Uma importante conclusão do trabalho de GENG et al. (1999) foi que uma vez que a ciclina E se torna ativada a ciclina D1 é provavelmente dispensada da progressão do ciclo celular. Esta observação talvez possa explicar os achados encontrados no trabalho de LIMA JÚNIOR (2006) com relação à diminuição da expressão de ciclina D1 em melanomas invasivos e metastáticos.

A quinase dependente de ciclina 2 (CDK2) é codificada pelo gene 12q13. A atividade desta proteína é especialmente crítica durante a transição G1 para a fase S.

GEORGIEVA et al. (2001) demonstraram aumento significativo na expressão de ciclina E CDK2 em metástases de melanoma. BALES et al. (1999) verificaram aumento de ciclina E em melanomas espessos.

Entende-se que a divisão celular é a chave dos processos neoplásicos e que as células em divisão dependem de ciclinas e quinases dependentes de ciclina para prosseguir o ciclo celular. Porém, a participação destas proteínas é controversa quando se refere ao melanoma cutâneo. LIMA JÚNIOR (2006) verificou que a diminuição da expressão de ciclina D1 em melanomas cutâneos primários foi relacionada de forma estatisticamente significativa à presença de metástase em linfonodo sentinela, demonstrando que talvez pudesse existir uma relação inversa entre a expressão de ciclina D1 e a progressão do tumor. Os próprios autores acreditavam que outros estudos moleculares permitiriam compreender melhor a participação do complexo ciclina D1/CDK4 na progressão tumoral. Desta forma, justifica-se a realização do presente estudo buscando compreender o papel do complexo ciclina E/CDK2 em relação ao complexo ciclina D1/CDK4 e a progressão do melanoma cutâneo, bem como correlacionar a diminuição da expressão de ciclina D1 observada por LIMA JÚNIOR (2006) com uma possível alteração do seu gene (CCND1).

2 OBJETIVOS

- 1 Estudar a expressão das proteínas controladoras do ciclo celular (Ciclina D1, CDK4, Ciclina E CDK2) por estudo imuno-histoquímico e verificar se há diferença na expressão destas proteínas nos melanomas cutâneos primários com e sem metástases em linfonodos sentinela.
- 2 Avaliar, através de hibridização “in situ” por fluorescência (FISH), deleções ou amplificações do gene CCND1, responsável pela Ciclina D1 nos melanomas cutâneos primários com e sem metástases em linfonodos sentinela.
- 3 Estabelecer correlações entre as variáveis estudadas e parâmetros histopatológicos como tipo de tumor, fase de crescimento, nível de Clark, espessura de Breslow, ulceração, índice mitótico, invasão angiolinfática, invasão perineural, entre outros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto de pesquisa foi submetido à avaliação e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente (Registro no: 1749/13).

3.2 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de estudo retrospectivo.

Foram utilizadas amostras de melanoma cutâneo primário que foram revisados ou diagnosticados no Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, de pacientes submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela, no período de 1998 a 2008, cujos blocos de parafina estavam disponíveis no arquivo.

Foram utilizados três blocos de *tissue microarray* (TMA), totalizando 234 amostras, algumas em duplicata, que correspondem a melanomas primários de 157 pacientes.

3.3 REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS

Os prontuários dos pacientes foram revistos para confecção de banco de dados e análise de variáveis demográficas (sexo, idade, localização do tumor, entre outras), de estadiamento, tratamento e evolução clínica.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- ✓ Pacientes cujo diagnóstico de melanoma foi realizado no Centro de Tratamento e Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela, com blocos de parafina disponíveis nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica e que contenham material suficiente para o estudo.
- ✓ Pacientes cujo seguimento clínico encontrado nos prontuários seja de pelo menos dois anos a partir do diagnóstico histopatológico de melanoma.

3.5 BANCO DE DADOS

O banco de dados foi confeccionado com informações completas de 157 casos. A amostra foi formada por melanomas primários de homens (46,5%) e mulheres (53,5%) com positividade em linfonodo sentinela em 28% dos casos.

3.6 MÉTODO

Os preparados histológicos foram revistos e classificados de acordo com o protocolo diagnóstico estabelecido na Instituição.

3.6.1 Construção e análise do *tissue microarray* (TMA)

✓ Confecção do bloco de parafina de TMA

A partir do corte original corado em HE as áreas de tumor foram marcadas com caneta e serviram de guia para identificação da área equivalente a ser puncionada no bloco “doador”. O cilindro de tecido retirado do bloco doador foi transferido para o bloco receptor através do uso do equipamento disponível no Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center: *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA).

O bloco de TMA foi confeccionado com cilindros de 1mm de diâmetro. Utilizando-se um cilindro de tecido hepático ou placentário para orientação inicial de cada sequência dos casos utilizados.

3.6.2 Confecção das Lâminas de Vidro

A partir do bloco de TMA foram preparados cortes histológicos seriados em lâminas de vidro previamente tratadas com película aderente especial (Instrumedics USA) na espessura de 5 µm.

3.6.3 Estudo Imuno-histoquímico

Os seguintes marcadores biológicos serão utilizados no estudo:

- Anti-ciclina D1 – cell marquee – clone SP4 – cod. 241R
- Anti-CDK4 – abcam – cod. Ab7955
- Anti-ciclinaE – Neomarkers – clone 13A3 – cod. MS1060S1
- Anti-CDK2 – Neomarkers – clone 2B6 – cod. MS459

3.6.4 Estudo de Hibridização “in situ” por Fluorescência (FISH)

Os ensaios de FISH foram realizados através de sondas específicas para o gene da ciclina D1. Através da sonda satélite (11p11.11-q11 Alpha Satellite DNA) com fluorocromo verde marcando a posição do centrômero e através da sonda 11q13.3 com fluorocromo laranja marcando o locus do gene da ciclina D1 (LSI Cyclin D1 / CEP11; marca:Vysis – cod. 32-191039)

3.6.5 Protocolo de reações

✓ Reação imuno-Histoquímica

Realizado corte do material em lâminas carregadas (Starfrost) e deixadas por 24 horas em estufa a 60°C. Em seguida foram submetidas a desparafinização em xilol a 60°C por 20 minutos e então xilol à temperatura ambiente por 20 minutos.

Posteriormente foi realizada a preparação das lâminas através de passagens sucessivas em etanol a cada 30 segundos (100%, 95% e 70%) e então lavadas em água corrente. As lâminas foram submetidas à recuperação antigênica pelo calor, utilizando-se panela de pressão (Eterna®, Nigra) e solução tampão citrato 10mM pH 6,0. A seguir, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol.), com quatro trocas de 5 minutos cada, seguida de lavagens com solução salina tamponada com fosfatos (PBS - phosphate buffered saline - 10 mM e pH 7,2) por 5 minutos. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em título pré estabelecido, em tampão PBS, contendo albumina bovina (BSA) a 1% (SIGMA, A9647, USA) e azida sódica (NaN₃) a 0,1%, por 18 horas, a 4°C, em câmara úmida. Após a incubação as lâminas foram lavadas em solução tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada. Iniciou-se, então, a incubação das lâminas com o anticorpo secundário biotinilado-reagente C (Biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig) do kit StreptABComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (Dako A/S, K492, Denmark) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C e posterior lavagem em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada. Em seguida, incubou-se, o complexo reagente A (Streptavidin) no título pré estabelecido de 1:200 e reagente B (Biotinylated Peroxydase) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C e posterior lavagem em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada. Para os anticorpos primários (cyclina E e CDK2) as lâminas foram incubadas em solução substrato 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 60mg% (Sigma, D-5637 USA), 1ml_ de dimetilsulfóxido (DMSO), 1ml_ de água oxigenada 6%, 100ml_ de PBS, por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Após a observação do desenvolvimento

do precipitado castanho, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por 3 minutos e contracoradas com Hematoxilina de Harris (Merck) por 1 minuto. Para os anticorpos primários (ciclina D1 e CDK4) as lâminas foram incubadas em solução preparada com *permanent red* a temperatura ambiente por 15-30 minutos, seguido da lavagem com água destilada. Seguiu-se, a desidratação das lâminas em etanol e xilol e subsequente montagem das mesmas para a leitura. As reações foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado, e controle negativo, realizado pela omissão do anticorpo primário.

✓ **Hibridização “in situ” por Fluorescência (FISH)**

Realizado o corte do material em lâminas carregadas (Starfrost) e deixadas por 24 horas em estufa a 60°C. Os cortes histológicos com 3 micra de espessura foram acondicionados nestas lâminas e submetidos a desparafinização em xilol a 20-25°C por 5 minutos trocando-o e imergindo por mais 5 minutos. Retirou-se o excesso de líquido e colocou-se as lâminas em etanol 96% por 2 min, duas vezes. O excesso de líquido foi retirado e as lâminas foram colocadas em etanol 70% por 2 min, duas vezes. Após a retirada do excesso de líquido as lâminas foram colocadas em solução em tampão. Após, foram colocadas por 10 minutos na solução de pré tratamento, pré-aquecidas em banho Maria a 96° C. Em seguida deixou-se esfriando por 15 minutos em temperatura ambiente. Após este procedimento, realizou-se 3 passagens no tampão de lavagem, cada uma com duração de 3 minutos. Os cortes foram submetidos à digestão enzimática com pepsina (concentração não fornecida pelo fabricante) por 25 minutos em temperatura ambiente, lavados com tampão de lavagem (3 trocas, 3 minutos cada passagem), desidratados com etanol em concentrações crescentes (70%, 85% e 96%, 2 minutos cada) e secadas na

temperatura ambiente por cerca de 45 minutos. Em seguida realizou-se a aplicação da sonda (10 ul, previamente diluída em tampão de hibridização pelo fabricante) sobre os cortes de tecido, cobertos com lamínula e vedados com material selante. Foi utilizada a sonda CCND1 (Vysis LSI cyclin D1 -dual color 1q13). As lâminas foram colocadas no hibridizador (Hybridizer - DAKO®) e realizou-se a codenaturação da sonda e espécime por 5 minutos a 80° C, seguindo-se de hibridização a 37° C por 16 horas. No segundo dia, os cortes foram retirados do hibridizador e, após remoção do selante foram colocados por 10 minutos em uma solução adstringente pré-aquecida a 65° C, lavados com tampão de lavagem (3 passagens de 3 minutos cada), desidratados com passagens em etanol (70%, 85% e 96%, 2 minutos cada) e secaram por cerca de 1 hora em local escuro. A seguir procedeu-se a contracoloração com 20 ul de DAPI e montagem com lamínula. Após 15 minutos, as lâminas foram levadas para observação no microscópio trinocular com fluorescência de mercúrio (Olympus® 30 BX41-FL-III), equipado com objetiva de imersão e com os filtros adequados.

3.6.6 Leitura das Lâminas

- As lâminas de TMA foram analisadas considerando válida a observação de pelo menos vinte e cinco por cento do tecido representado em cada amostra do TMA.
- Para marcadores nucleares (ciclina D1 e ciclina E) utilizou-se método semi-quantitativo considerando-se a proporção de células dentro do tumor com positividade nuclear. O ponto de corte para cada anticorpo foi determinado através de dados da literatura (REED et al. 1995; MAELANDSMO et al. 1996;

KARJALAINEN et al. 1999; FLORENES et al. 2002; KLAES et al. 2001; ALONSO et al. 2004).

AC	NEGATIVO	POSITIVO
Ciclina D1	< 5%	≥ 5%
Ciclina E	< 5%	≥ 5%

Para marcadores citoplasmáticos (CDK2 e CDK4) utilizou-se método semi-quantitativo considerando-se a intensidade da marcação e a proporção de células tumorais marcadas baseado em dados de literatura (SOINI et al. 2001; BACHMANN et al. 2004). A pontuação final foi determinada através da soma dos escores de intensidade e proporção. Foram considerados positivos os casos com soma de escores final maior que 4.

Cdk4 / Cdk2 - marcação citoplasmática	
Intensidade	Proporção de células marcadas
0 = negativo	0 = negativo
1 = fraca	1 = 1 a 10%
2 = moderada	2 = 11 a 50%
3 = forte	3 = mais de 50%

As lâminas de FISH foram analisadas em microscópio triocular com fluorescência de mercúrio (Olympus® 30 BX41-FL-III), equipado com objetiva de imersão e filtros adequados. Foi considerado resultado normal a presença de dois sinais verdes (centrômeros) e dois sinais vermelhos (gene). Amplificação foi considerada quando a razão gene/centrômero foi superior a 2, polissomia quando houve aumento tanto do gene quanto do centrômero com razão menor ou igual a 1 e

ganho quando houve aumento do gene em relação ao centrômero mas com razão maior do que 1 e menor que 2.

3.6.7 Análise Estatística

As informações coletadas foram armazenadas em banco de dados informatizado e analisadas através do programa *Statistical Package for Social Science – SPSS®* (versão 22.0).

As descrições da população, o exame anatomopatológico, o status linfonodal e os resultados obtidos a partir da IHQ foram realizadas por meio de estatística descritiva (média, desvio-padrão-dp, mediana e porcentagens).

A associação entre a metástase no linfonodo sentinela e as variáveis sociodemográficas, histopatológicas e moleculares foram avaliadas ou pelo teste de qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher, dependendo dos valores esperados nas tabelas de contingência. O teste de qui-quadrado foi utilizado quando a tabela de contingência continha frequências esperadas abaixo de 5 em até 20,0% das caselas e nenhuma frequência esperada abaixo de 2. Quando estas condições foram violadas, empregou-se o teste exato de Fisher (DAWSON-SAUNDERS e TRAPP 2004). Nesta etapa, algumas variáveis quantitativas ou outras qualitativas com mais de 2 categorias foram testadas com diversos pontos de corte. As variáveis com nível descritivo de até 0,150 foram selecionadas para o modelo de regressão logística múltipla. Na análise múltipla, empregou-se a estratégia de modelagem do tipo *stepwise forward selection* e estipulando-se o nível de significância em 5,0%. A estimativa de risco para a presença de metástase em linfonodo sentinela foi o *odds ratio* (OR) obtido da regressão logística múltipla.

4 RESULTADOS

Foram analisados 157 casos de melanoma cutâneo de pacientes que foram submetido a linfadenectomia seletiva (linfonodo sentinela).

4.1 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS

A idade ao diagnóstico variou de 23 a 85 anos (média = 54,04 e mediana = 53) sendo 58,6% dos pacientes com idade superior aos 50 anos. Houve predomínio de mulheres (53,5%). Quanto à localização do tumor primário 38,9% localizavam-se nos membros, seguido do tronco (36,9%) e, 5,1% dos tumores primários localizavam-se na cabeça e pescoço conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Número e porcentagem de pacientes segundo as variáveis demográficas e clínicas. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

Variável	Categoria	n (*)	(%)
Gênero	Feminino	84	(53,5)
	Masculino	73	(46,5)
Idade	< 50 anos	65	(41,4)
	≥ 50 anos	92	(58,6)
Localização do tumor	Cabeça e pescoço	8	(5,1)
	Tronco	58	(36,9)
	Membros	61	(38,9)
	Extremidades	30	(19,1)

4.2 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

O número e a porcentagem de pacientes segundo as variáveis histopatológicas estudadas estão detalhados na Tabela 2. Com relação ao tipo histológico houve predomínio do tipo extensivo superficial (66,2%), seguido do tipo acral (15,9%), nodular (9,6%), outros (1,9%) e lentigo maligno melanoma (0,7%). Em 97,5% dos tumores encontrou-se fase de crescimento vertical. Com relação aos níveis estabelecidos por Clark apenas um caso foi classificado como Clark I, 10 casos foram Clark II (6,4%), 81 casos foram Clark III (51,6%), 46 casos foram Clark IV (29,3%) e 18 casos foram Clark V (11,5%). Verificou-se espessura de Breslow menor que 1mm em 39 casos (24,8%), espessura maior que 1 mm e menor que 2mm em 46 casos (29,3%), espessura maior que 2 mm em 71 casos (45,2%). 27 casos não apresentavam mitoses em 10 CGA (17,2%), em 29 casos uma mitose foi observada em 10 CGA (18,5%) e mais de 1 mitose foi observada em 100 casos (63,7). Não foi observada invasão vascular. Invasão linfática foi observada em 6 casos (3,8%) e 5 casos apresentaram invasão neural (3,2%). A maioria dos casos 90,4% (142 casos) não apresentava áreas de regressão e a ulceração estava presente em 55 casos (35%). Microsatelitose foi encontrada em apenas 2 casos (1,3%). As margens de ressecção cirúrgica estavam comprometidas em 12,7% dos casos. A pesquisa de metástases em linfonodo sentinela resultou negativa em 113 casos (72%), sendo, portanto, positiva em 44 casos (28%).

Tabela 2 - Número e porcentagem de espécimes segundo as variáveis histopatológicas estudadas. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

Variável	Categoria	n (*)	(%)
Tipo histológico	Extensivo superficial	104	(66,2)
	Nodular	15	(9,6)
	Lentigo maligno	1	(0,7)
	Acral	25	(15,9)
	Outros	12	(7,6)
Nível de Clark	I	1	(0,6)
	II	10	(6,4)
	III	81	(51,6)
	IV	46	(29,3)
	V	18	(11,5)
Espessura do tumor (Breslow)	0-1mm	39	(24,8)
	1,01-2mm	46	(29,3)
	>2 mm	71	(45,2)
Índice mitótico	0	27	(17,2)
	1	29	(18,5)
	>1	100	(63,7)
Invasão linfática	Não	150	(95,5)
	Sim	6	(3,8)
Invasão neural	Não	151	(96,2)
	Sim	5	(3,2)
Regressão	Não	142	(90,4)
	Sim	14	(8,9)
Ulceração	Não	101	(64,3)
	Sim	55	(35)
Microsatelitose	Não	154	(98,1)
	Sim	2	(1,3)
Margens	Livres	137	(87,3)
	Comprometidas	20	(12,7)

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

4.3 EXPRESSÃO PROTÉICA POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

4.3.1 Ciclina D1

A análise da expressão de ciclina D1 foi obtida em 149 casos. Houve positividade em 32,2% dos casos, cuja distribuição com relação à espessura de Breslow está demonstrada na Tabela 3.

Tabela 3 - Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de ciclina D1. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

			Ciclina D1		Ciclina D1		Total	
			(negativo)		(positivo)			
			n	(%)	n	(%)	n (%)	p
Espessura do tumor (Breslow)	0-1,0mm		26	(25,7)	12	(25)	38 (25,5)	
	1,01-2,0mm		29	(28,7)	14	(29,2)	43 (28,9)	0,995*
	> 2 mm		46	(45,5)	22	(45,8)	68 (45,6)	
Total			101	(100)	48	(100)	149	
							(100)	

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

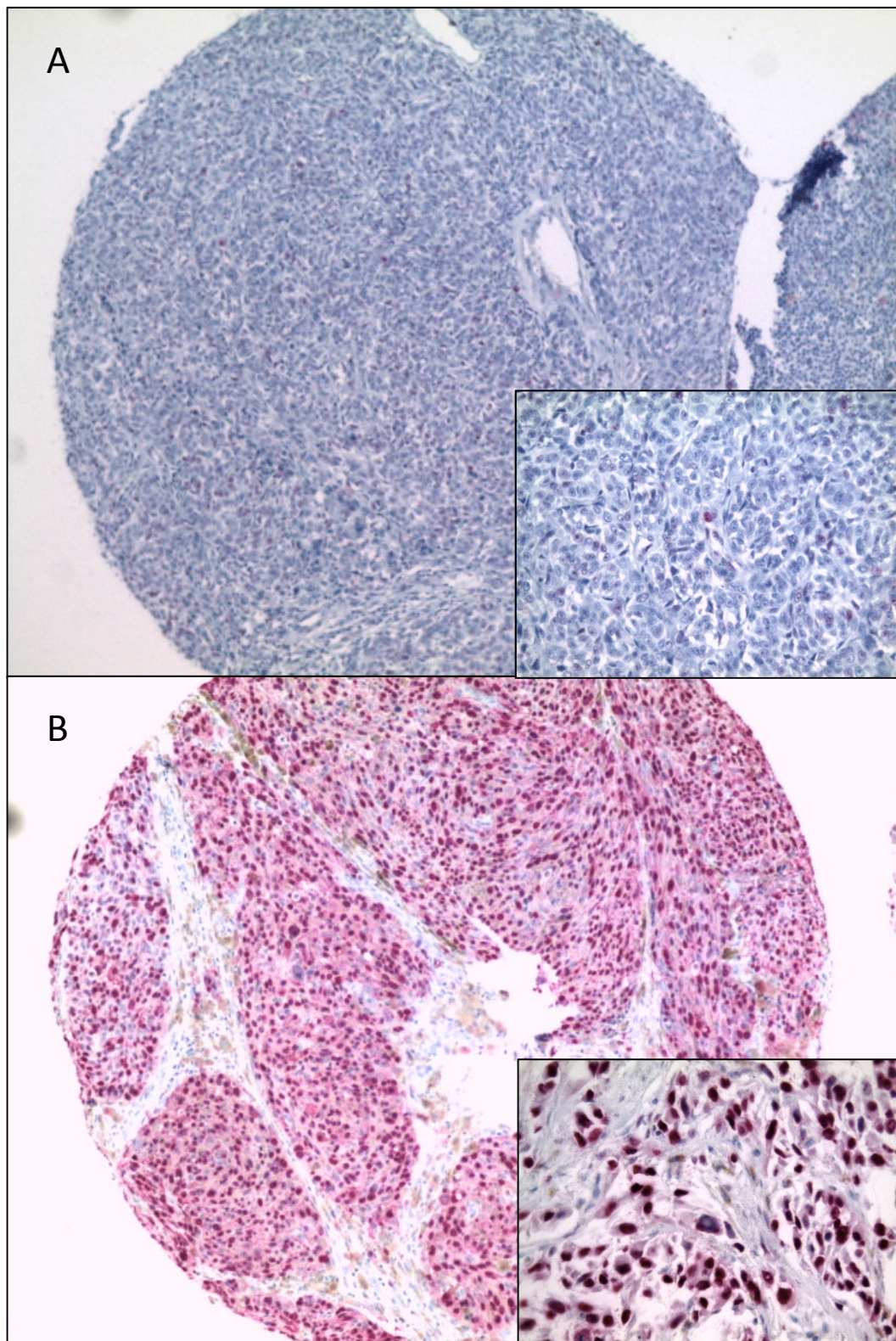


Figura 5 - Estudo imuno-histoquímico para ciclina D1 nas células de melanoma cutâneo. Pode-se observar em (A) marcação nuclear negativa para ciclina D1 nas células de melanoma cutâneo (x40 - detalhe X400). Em (B) observa-se expressão nuclear positiva para ciclina D1 nas células de melanoma cutâneo (x40 - detalhe x400).

4.3.2 CDK4

Foi possível análise da expressão de CDK4 em 150 casos. Foram considerados positivos os casos em que a soma da pontuação referente à intensidade da reação (0-4) e a porcentagem de células marcadas (0-4) foi superior a 4. Em 16 casos não houve expressão de CDK4. Em 25 casos houve marcação citoplasmática leve. Em 109 casos observou-se marcação moderada e intensa, considerados como positivos. (Figuras 6, 7 e 8). A distribuição da imunomarcação para CDK4 com relação à espessura de Breslow está demonstrada na Tabela 4.

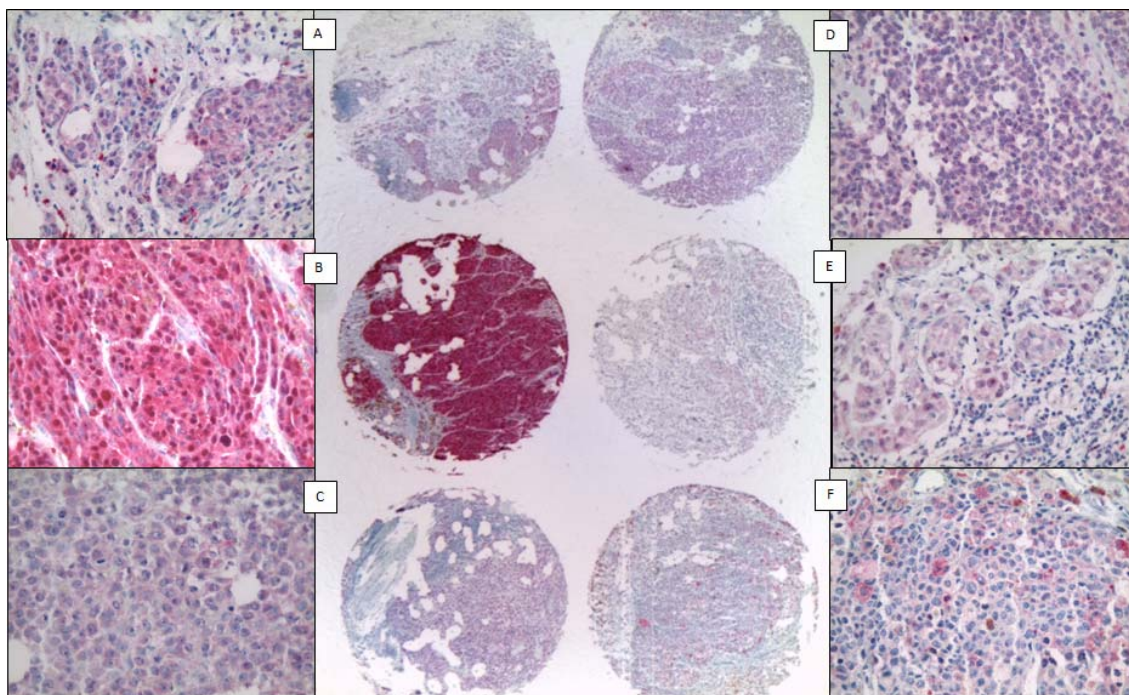


Figura 6 - Estudo imuno-histoquímico para CDK4 nas células de melanoma cutâneo. Observa-se em (B) marcação citoplasmática forte; em (A) e (D) marcação citoplasmática moderada; em (C) e (E) marcação citoplasmática fraca e em (F) marcação citoplasmática negativa. Nota-se ainda marcação nuclear forte em (B).

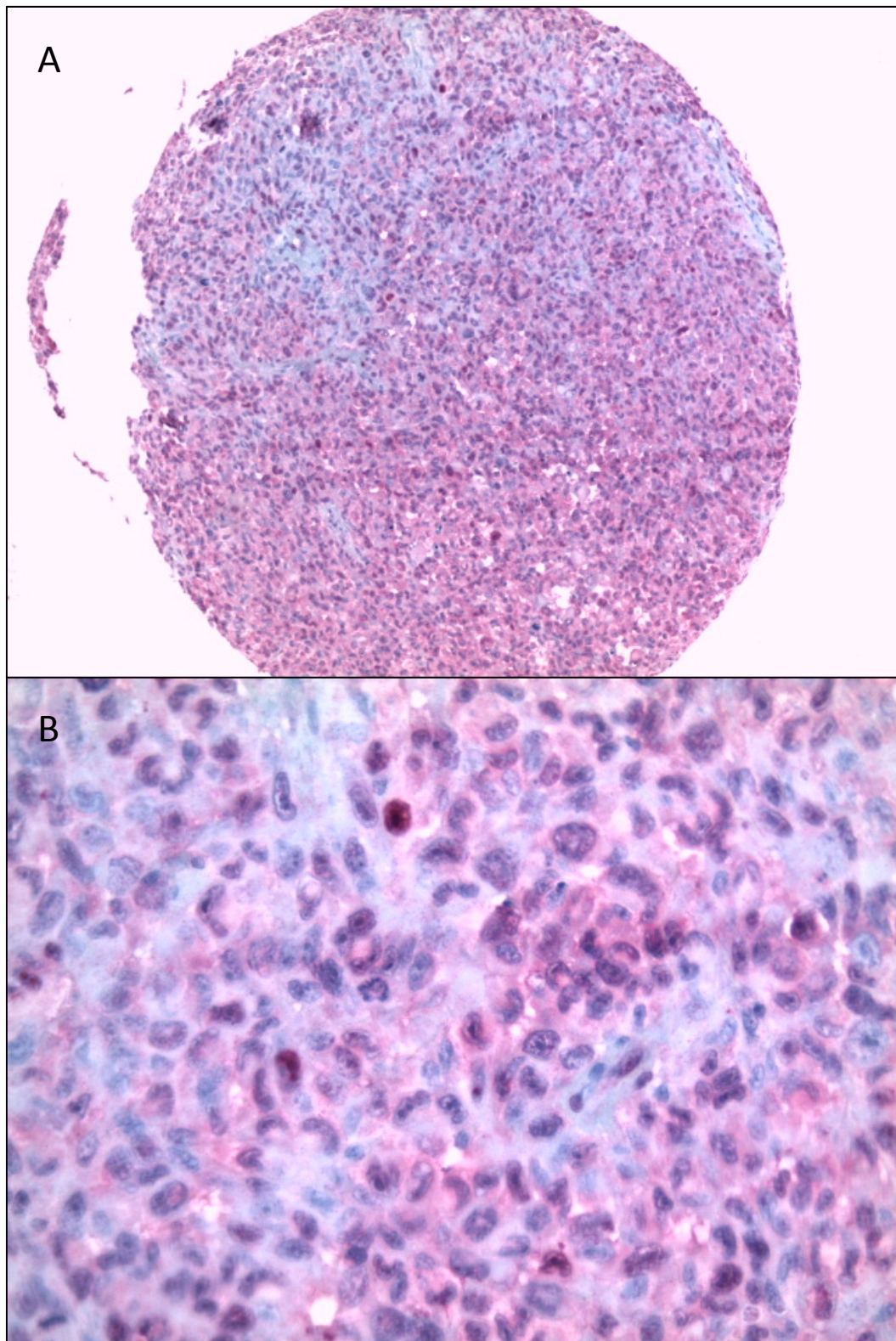


Figura 7 - Estudo imuno-histoquímico para CDK4 nas células de melanoma cutâneo com expressão negativa. Observa-se em **(A)** expressão citoplasmática fraca e expressão nuclear para CDK4 em poucas células (X100). Em **(B)** observa-se o detalhe das células tumorais onde se observa marcação citoplasmática leve e rara marcação nuclear para CDK4 (X400).

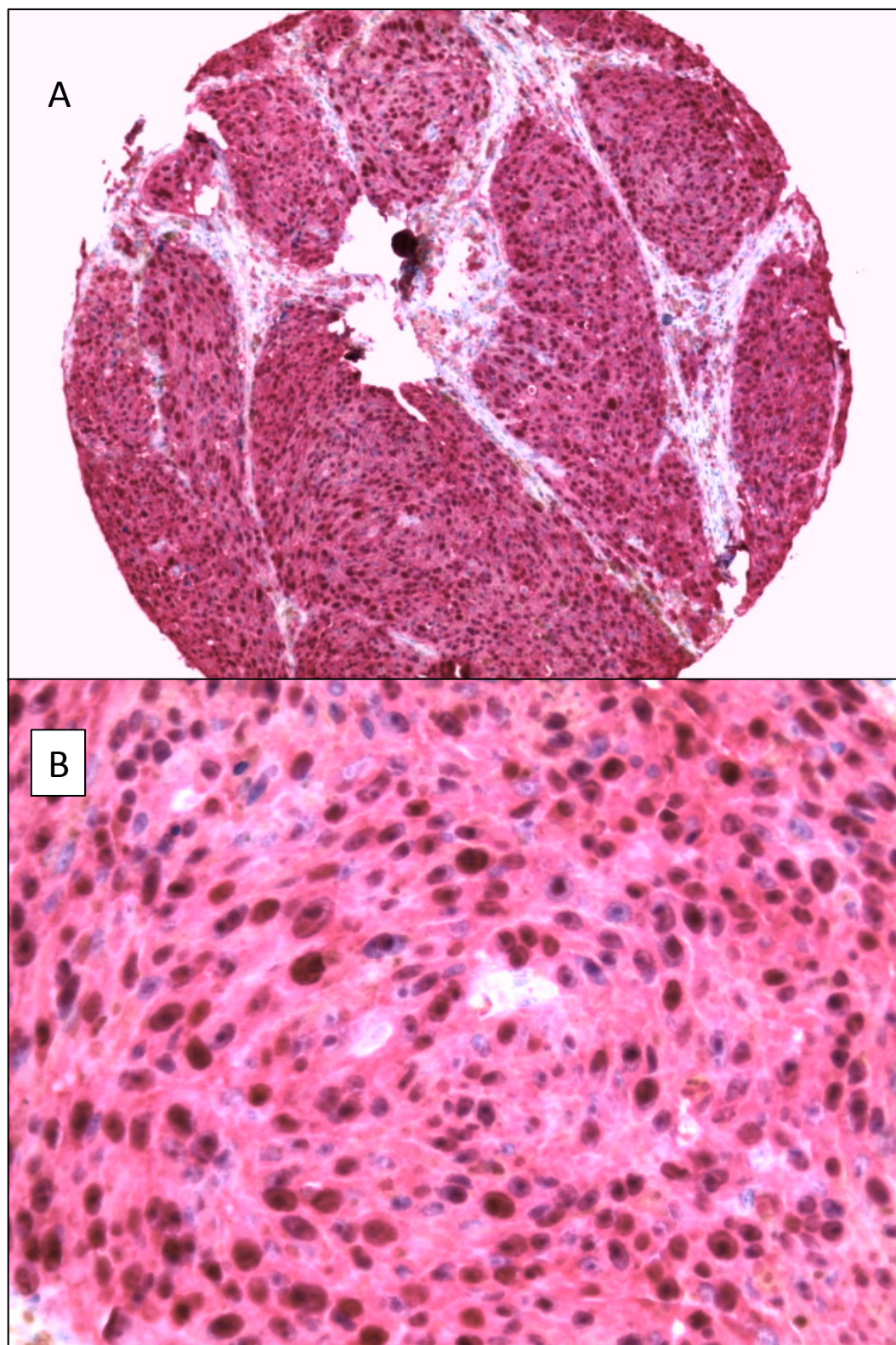


Figura 8 - Estudo imuno-histoquímico para CDK4 nas células de melanoma cutâneo com expressão positiva. Observa-se em (A) expressão citoplasmática forte e expressão nuclear positiva para CDK4 na maioria das células (X100). Em (B) nota-se em detalhe as células tumorais com expressão nuclear e citoplasmática para CDK4 (X400).

Tabela 4 - Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de CDK4. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

			CDK4 (negativo)		CDK4 (positivo)		p
			n	(%)	n	(%)	
Espessura do tumor (Breslow)		0-1,0mm	16	(39,0)	23	(21,1)	0,06*
		1,01-2,0mm	12	(29,3)	32	(29,4)	
		> 2 mm	13	(31,7)	54	(49,5)	

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

4.3.3 Ciclina E

Foi possível análise da expressão de Ciclina E em 152 casos. Foi considerada positiva a marcação nuclear. Em 117 casos não houve expressão de Ciclina E. Em 35 casos observou-se marcação positiva, cuja distribuição com relação à espessura de Breslow está demonstrada na Tabela 5.

Tabela 5 - Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de Ciclina E. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

			Ciclina E (negativo)		Ciclina E (positivo)		p
			n	(%)	n	(%)	
Espessura do tumor (Breslow)		0-1,0mm	29	(24,8)	10	(28,6)	0,897*
		1,01-2,0mm	34	(29,1)	10	(28,6)	
		> 2 mm	54	(46,2)	15	(42,9)	

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

Tabela 6 - Número e porcentagem de pacientes segundo a marcação nuclear de Ciclina D1 e Ciclina E (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

		Ciclina E			
		Negativo	(%)	Positivo	(%)
Ciclina D1	Negativo	78	(52,7)	24	(16,2)
	Positivo	37	(25)	9	(6,1)

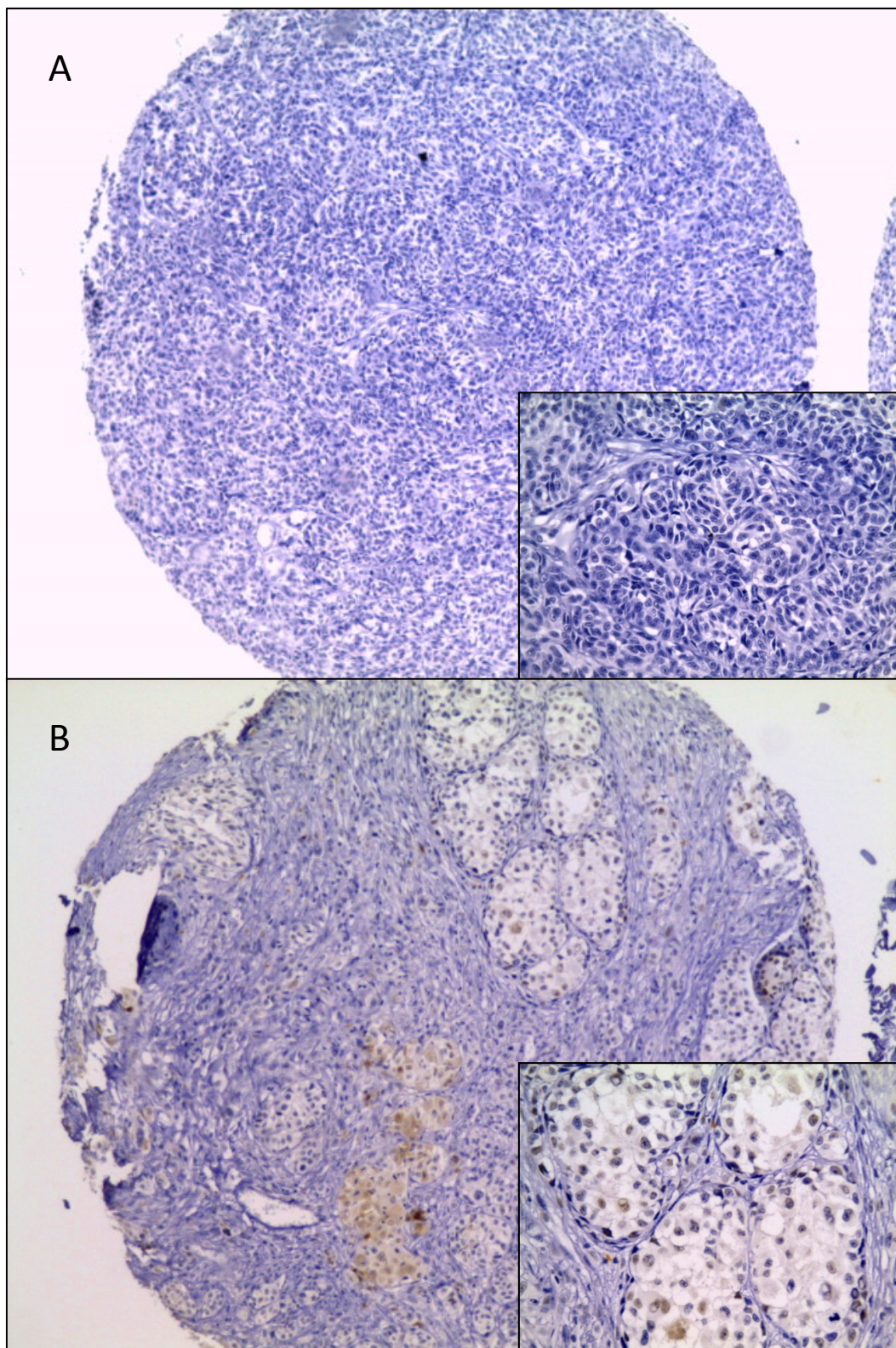


Figura 9 - Estudo imuno-histoquímico para ciclina E nas células de melanoma cutâneo. Observa-se em (A) expressão nuclear negativa para ciclina E nas células de melanoma cutâneo (x40 - detalhe X400). E em (B) expressão nuclear positiva para ciclina E nas células de melanoma cutâneo (x40 - detalhe x400).

4.3.4 CDK2

Foi possível análise da expressão de CDK2 em 155 casos. Em 148 casos observou-se marcação leve, moderada e intensa. Foram considerados positivos os casos em que a soma da pontuação referente à intensidade da reação (0-4) e a porcentagem de células marcadas (0-4) foi superior a 4. Dos 13 casos negativos, a ausência de marcação foi observada em 5 casos e os demais apresentavam marcação citoplasmática leve. A imunomarcação para cdk2 com relação à espessura de Breslow está demonstrada na Tabela 7.

Tabela 7 - Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão de CDK2. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

			CDK2 (negativo)		CDK2 (positivo)		p
			n	(%)	n	(%)	
Espessura do tumor (Breslow)	0-1,0mm		6	(46,2)	33	(23,2)	0,129*
	1,01-2,0mm		4	(30,8)	41	(28,9)	
	> 2 mm		3	(23,1)	68	(47,9)	

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

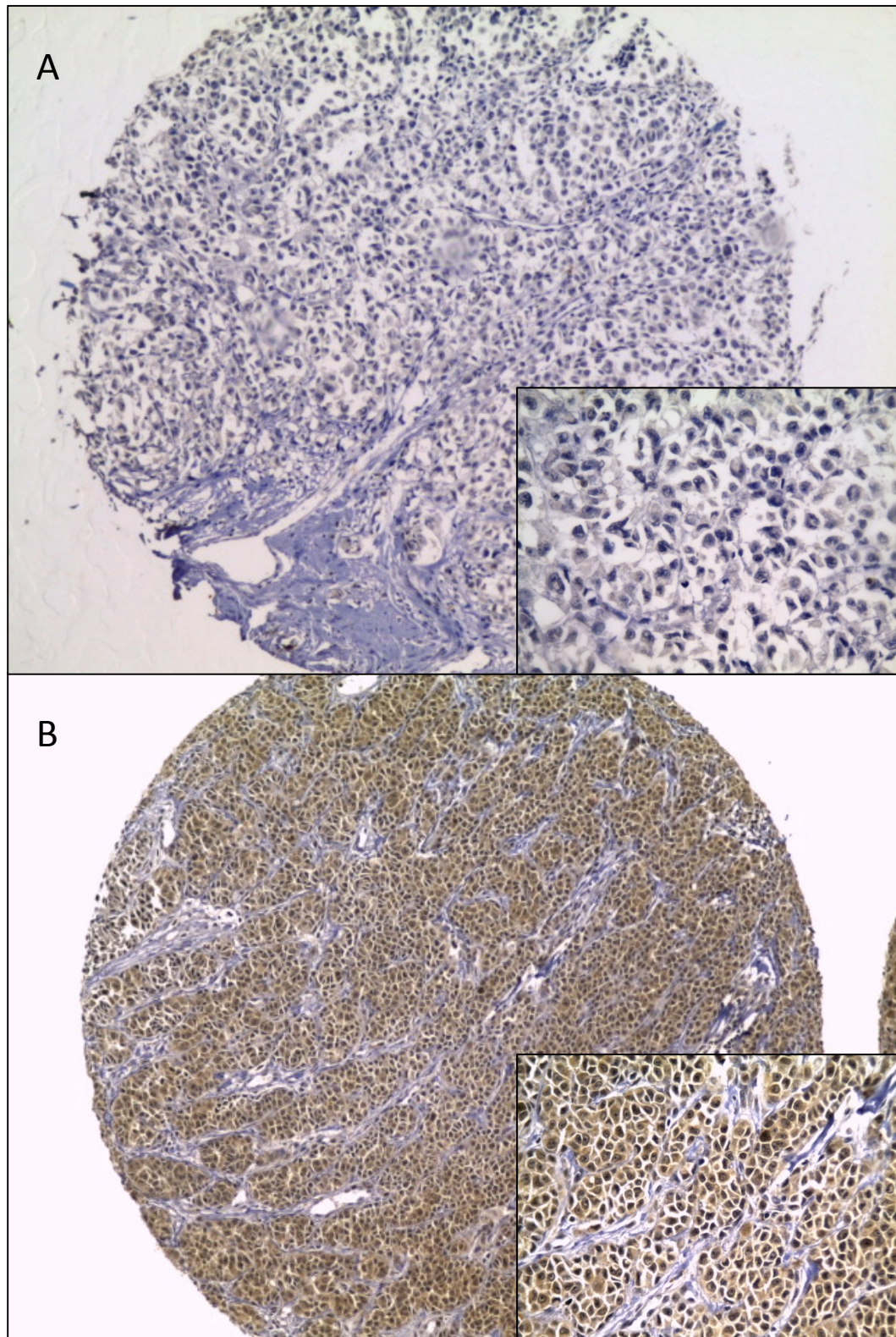


Figura 10 - Estudo imuno-histoquímico para CDK2 nas células de melanoma cutâneo. Observa-se em **(A)** expressão nuclear negativa para CDK2 nas células de melanoma cutâneo (x40 - detalhe X400). Nota-se em **(B)** expressão nuclear positiva para CDK2 nas células de melanoma cutâneo (x40 - detalhe x400).

4.3.5 FISH

Foi possível análise da expressão do gene CCND1 por FISH em 122 casos. Em 102 casos observou-se integridade do gene da ciclina D1 e da região centromérica, sendo considerada como “expressão normal” (65%). Em 9 casos observou-se amplificação (5,7%), em 9 casos polissomia (5,7%) e em 2 casos observou-se ganho (1,3%). A distribuição com relação à espessura de Breslow está demonstrada na Tabela 8.

Tabela 8 - Número e porcentagem de pacientes segundo a espessura do tumor (Breslow) e a análise da expressão do gene CCND1 por FISH. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

		FISH							
		Normal		Amplificação		Polissomia		ganho	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Espessura do tumor (Breslow)	0-1,0mm	24	(23,5)	2	(22,2)	1	(11,1)	1	(50)
	1,01-2,0mm	18	(17,6)	1	(11,1)	1	(11,1)	0	(0)
	> 2 mm	60	(58,9)	6	(66,7)	7	(77,8)	1	(50)

4.4 VARIÁVEIS ASSOCIADAS À PRESENÇA DE METÁSTASE DE MELANOMA EM LINFONODO SENTINELA

4.4.1 Análise Univariada

✓ Variáveis sociodemográficas

Nenhuma variável sociodemográfica mostrou associação estatisticamente significativa com a presença de metástase no linfonodo sentinela (Tabela 10).

Tabela 9 - Número e porcentagem de pacientes segundo o status para metástases em linfonodo sentinela (LNS) e as variáveis demográficas e clínicas estudadas. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

Variável	Categoria	LNS (+)		LNS (-)		p
		N (*)	(%)	n (*)	(%)	
sexo	Feminino	26	(59,1)	58	(51,3)	0,381 ^(a)
	Masculino	18	(40,9)	55	(48,7)	
Localização do tumor	Extremidades	8	(18,2)	22	(19,5)	0,987 ^(a)
	Cabeça e pescoço	2	(4,5)	6	(5,3)	
	Membros	18	(40,9)	43	(38,1)	
	Tronco	16	(36,4)	42	(37,2)	

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

✓ Variáveis histopatológicas

Não houve relação estatisticamente significativa entre o tipo histológico, nível de Clark, espessura do tumor (Breslow), índice mitótico, invasão neural, regressão e margens cirúrgicas e metástase em linfonodo sentinela. Invasão linfática ($p=0,033$) e ulceração ($p=0,041$) se mostraram de forma estatisticamente significativa relacionadas à metástase em linfonodo sentinela.

Tabela 10 - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de metástases em linfonodo sentinela (LNS) e as variáveis histopatológicas estudadas. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

Variável	Categoria	LNS (+)		LNS (-)		P
		n (*)	(%)	n (*)	(%)	
Tipo histológico	Extensivo superficial	26	(59,1)	79	(69)	0,481 ^(a)
	Nodular	5	(11,4)	10	(8,8)	
	Lentigo maligno	0	(0)	1	(0,9)	
	Acral	7	(15,9)	18	(15,9)	
	Outros	0	(0)	2	(2,4)	
	Não classificável	5	(11,4)	4	(3,5)	
Nível de Clark	I	0	(0)	1	(0,9)	0,184 ^(a)
	II	4	(9,1)	6	(5,4)	
	III	20	(45,5)	61	(54,5)	
	IV	11	(25)	35	(31,3)	
	V	9	(8)	9	(20,5)	
Espessura do tumor (Breslow)	0-1mm	12	(27,3)	27	(24,1)	0,296 ^(a)
	1,01-2mm	9	(20,5)	37	(33)	
	>2 mm	23	(52,3)	48	(42,9)	
Índice mitótico	0	8	(18,2)	19	(17)	0,608 ^(a)
	1	6	(13,6)	23	(20,5)	
	>1	30	(68,2)	70	(62,5)	
Invasão linfática	Não	40	(90,9)	110	(98,2)	0,033 ^(b)
	Sim	4	(9,1)	2	(1,8)	
Invasão neural	Não	41	(93,2)	110	(98,2)	0,108 ^(b)
	Sim	3	(6,8)	2	(1,8)	
Regressão	Não	43	(97,7)	99	(88,4)	0,066 ^(b)
	Sim	1	(2,3)	13	(11,6)	
Ulceração	Não	23	(52,3)	78	(69,6)	0,041 ^(a)
	Sim	21	(47,7)	34	(30,4)	
Margens	Livres	40	(90,9)	97	(85,8)	0,392 ^(a)
	Comprometidas	4	(9,1)	16	(14,2)	

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

(b) Teste exato de Fisher

✓ **Variáveis moleculares**

Das variáveis moleculares estudadas nenhuma delas apresentou associação estatisticamente significativa com metástases no linfonodo sentinela (Tabelas 11 a 16).

Tabela 11 - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de metástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de ciclina D1. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

		LNS positivo		LNS negativo		p
		n(*)	(%)	n(*)	(%)	
Ciclina D1	Negativo	29	(69)	73	(67,6)	0,864 ^(a)
	Positivo	13	(31)	35	(32,4)	

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

Tabela 12 - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de metástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de CDK4. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

		LNS positivo		LNS negativo		p
		n(*)	(%)	n(*)	(%)	
CDK4	Negativo	5	(12,5)	13	(12,3)	0,969 ^(a)
	Positivo	35	(87,5)	93	(87,7)	

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

Tabela 13 - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de metástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de ciclina E. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

		LNS positivo		LNS negativo		p
		n(*)	(%)	n(*)	(%)	
Ciclina E	Negativo	33	(76,7)	85	(77,3)	0,944 ^(a)
	Positivo	10	(23,3)	25	(22,7)	

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

Tabela 14 - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de metástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão de CDK 2. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

		LNS positivo		LNS negativo		p
		n(*)	(%)	n(*)	(%)	
CDK 2	Negativo	4	(9,1)	9	(8)	0,830 ^(a)
	Positivo	40	(90,9)	103	(92)	

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

Tabela 15 - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença de metástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão do gene CCND1 por FISH. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

		LNS positivo		LNS negativo		p
		n(*)	(%)	n(*)	(%)	
FISH	Normal	29	(76,3)	73	(86,9)	0,361 ^(a)
	Amplificação	3	(7,9)	6	(7,1)	
	Polissomia	5	(13,2)	4	(4,8)	
	Ganho	1	(2,6)	1	(1,2)	

(*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

(a) Teste de associação pelo qui-quadrado

Tabela 16 - Número e porcentagem de pacientes com melanoma acral segundo a presença de metástases em linfonodo sentinela (LNS) e a análise da expressão do gene CCND1 por FISH. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

		LNS positivo		LNS negativo	
		n(*)	(%)	n(*)	(%)
FISH	Normal	4	(57,2)	17	(94,5)
	Amplificação	0	(0)	1	(5,5)
	Polissomia	3	(42,8)	0	(0)
	Ganho	0	(0)	0	(0)

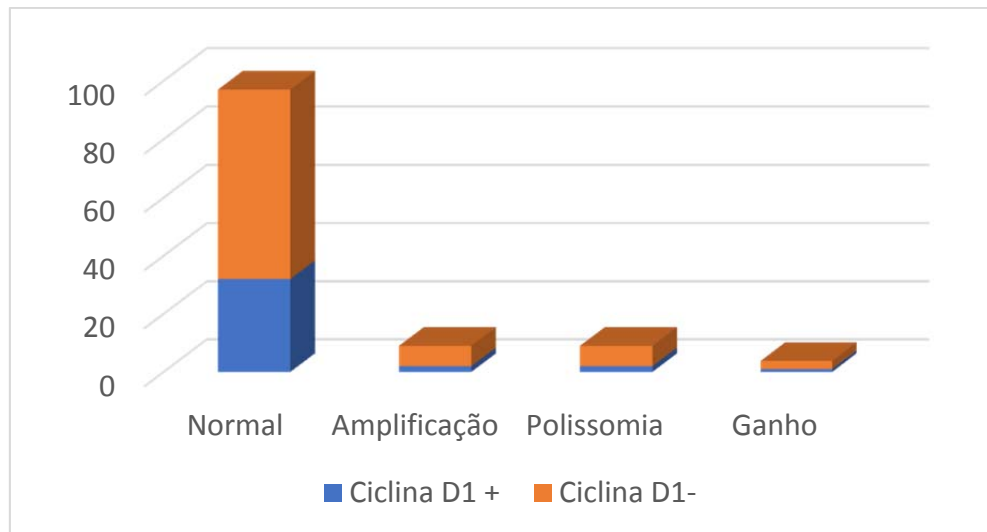


Figura 11 - Gráfico da expressão do gene CCND1 por FISH e expressão de ciclina D1 por imuno-histoquímica. (A.C.Camargo Cancer Center. 1998-2008).

5 DISCUSSÃO

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) o câncer de pele corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados no Brasil, sendo considerado o mais frequente. O melanoma cutâneo representa 3% das neoplasias imaturas (malignas) da pele, sendo sua incidência considerada baixa por alguns autores. Porém, pode ser considerado um tumor enigmático e potencialmente letal (Ministério da Saúde 2016).

Sabe-se que o mais importante indicador prognóstico continua sendo a espessura do tumor e, portanto, o desafio clínico está na detecção precoce de melanomas cutâneos. Porém, nos casos de tumores mais espessos, a busca de fatores para a definição do estadiamento, do prognóstico e da melhora da sobrevida destes pacientes tem motivado diversos estudos sobre o assunto.

O A.C.Camargo Cancer Center de São Paulo é considerado centro de referência no tratamento de câncer buscando constantemente o aprimoramento técnico e científico incentivando inúmeros pesquisadores a desenvolver estudos científicos em diversas áreas.

Em sua dissertação de mestrado LIMA JÚNIOR (2006) analisou a expressão das proteínas controladoras do ciclo celular (Ciclina D1, CDK4, p16ink4, p21WAF1), da adesão celular (integrina $\alpha\text{v}\beta 3$) e enzimas proteolíticas através da ativação da metaloproteinase-2 (MMP-2) e metaloproteinase-9 (MMP-9) em lesões cutâneas de melanomas que evoluíram com e sem metástases em linfonodo sentinela, através de estudo imuno-histoquímico. Verificou-se correlação entre a ausência de

expressão de ciclina D1 e presença de metástase em linfonodo sentinela. Tal correlação mostrou-se estatisticamente significativa tanto na análise univariada quanto na análise multivariada, sugerindo que a ausência de ciclina D1 pudesse ser considerada como fator prognóstico para o desenvolvimento de metástases nodais de melanoma cutâneo, motivando a realização deste estudo.

O emprego da técnica de tissue microarray (TMA) tem se tornado cada vez mais comum em nosso meio. PACIFICO et al. (2004) compararam dados obtidos através da técnica de tissue microarray com outros dados obtidos em cortes convencionais para estudo imuno-histoquímico de melanomas. Tissue microarray permite estudar o perfil molecular de diversos espécimes de tecidos por diferentes técnicas, inclusive, imuno-histoquímica (HOOS et al. 2001).

A técnica requer, para cada caso, a marcação da área de interesse na lâmina de vidro com corte histológico convencional que servirá de “guia” para localizar esta mesma área no bloco de parafina. Após a identificação desta área um cilindro de tecido é retirado e inserido no bloco de parafina receptor. Repete-se este procedimento para cada amostra. Após confeccionar o bloco de TMA são confeccionadas lâminas com cortes que serão submetidas às técnicas laboratoriais como H&E, imuno-histoquímica, FISH, entre outras. Em qualquer etapa deste processo podem ocorrer falhas que variam desde representação de áreas sem interesse, desgaste do bloco com tumor, descolamento do cilindro inserido, descolamento do corte histológico, falha na coloração, etc. No presente estudo foram utilizados cinco blocos de TMA totalizando com 336 amostras de melanoma cutâneo primário diagnosticado no Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, de pacientes submetidos à

pesquisa de linfonodo sentinela, no período de 1998 a 2008. Algumas destas amostras pertencem ao mesmo tumor, sendo consideradas apenas como amostras duplicadas e não como novo sujeito do estudo. Não foram considerados neste estudo casos em que as informações obtidas no prontuário foram incompletas, bem como aqueles em que houve perda de material durante as etapas técnicas. Finalizou-se o estudo com 234 amostras válidas que correspondem ao melanoma primário de 157 pacientes.

O presente estudo é de coorte retrospectivo, realizado com pacientes portadores de melanoma cutâneo. Estes pacientes procuraram o Serviço de Oncologia Cutânea do A.C.Camargo Cancer Center ou foram encaminhados, com o diagnóstico e estadiamento clínico inicial, para sequência de tratamento no período de 1998 a 2008. Todos os pacientes do estudo foram submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela e o exame anatomopatológico do linfonodo foi realizado no Departamento de Anatomia Patológica da Instituição.

As informações demográficas e clínicas foram obtidas através da análise dos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico-SAME.

No presente estudo a idade média ao diagnóstico foi de 54 anos (mediana 53), sendo 58,6% dos pacientes com idade superior aos 50 anos. Houve predomínio de mulheres (53,5%). A pesquisa de metástases em linfonodo sentinela resultou negativa em 113 casos (72%), sendo, portanto, positiva em 44 casos (28%).

Quanto à localização do tumor primário 38,9% localizavam-se nos membros, seguido do tronco (36,9%). Houve predomínio do tipo histológico extensivo superficial (66,2%), seguido do tipo acral (15,9%). Em 97,5% dos tumores encontrou-se fase de crescimento vertical. Estudos populacionais revelam que o tipo

histológico extensivo superficial é o mais prevalente representando cerca de 70% dos melanomas em geral, seguido do tipo nodular. A prevalência de tumores em fase vertical se deve a característica da população estudada, pacientes submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela, o que se correlaciona ao nível de Clark com 92,4% dos tumores classificados como Clark III, IV e V, com espessura de Breslow maior que 1mm em 75,2% dos casos. Com relação ao índice mitótico, 27 casos não apresentavam mitoses (17,2%), em 29 casos uma mitose foi observada em 10 CGA (18,5%) e mais de 1 mitose foi observada em 100 casos (63,7). Não houve relação entre o índice mitótico e metástase em LNS, mesmo quando se agrupam os casos com e sem mitose. Não foi observada invasão vascular. Invasão linfática foi observada em 6 casos (3,8%), dos quais 4 apresentaram metástase em LNS no momento do diagnóstico, considerada esta relação estatisticamente significativa. Invasão neural foi observada em 5 casos (3,2%) dos quais 3 apresentavam metástase em LNS. Um destes casos também apresentava invasão linfática e ulceração. A maioria dos casos 90,4% (142 casos) não apresentava áreas de regressão e a ulceração estava presente em 55 casos (35%), sendo considerada como uma variável histológica estatisticamente significativa relacionada à metástase em LNS. Microsatelitose foi encontrada em apenas 2 casos (1,3%). As margens de ressecção cirúrgica estavam comprometidas em 12,7% dos casos. Exceto invasão linfática e ulceração, as demais variáveis histológicas não apresentaram relação estatisticamente significativa com relação a presença de metástase em linfonodo sentinela.

Segundo a versão final do estadiamento do melanoma cutâneo elaborada pela *American Joint Committee on cancer* (AJCC) o Nível de Clark continua sendo considerado relevante embora venha sendo gradativamente abandonado e substituído

pela espessura segundo Breslow (BALCH et al. 2001). Ressalta-se que o nível de Clark está vinculado a grande número de protocolos de pesquisa e é uma informação histológica classicamente conhecida. No presente estudo, o nível de Clark não apresentou relação estatisticamente significativa para metástase em LNS.

A espessura expressa em milímetros determinada a partir da camada granulosa até a célula neoplásica mais profunda do tumor é definida como espessura de Breslow. Esta variável histológica isoladamente continua sendo a de maior impacto na determinação da sobrevida global em cinco anos e, portanto, é considerado o fator prognóstico isolado mais importante nos pacientes com melanoma localizado (BRESLOW 1970; BALCH et al. 2001). No presente estudo a espessura de Breslow não apresentou relação estatisticamente significativa com presença de metástase em linfonodo sentinela. Os autores acreditam que nesta amostra os casos de melanoma fino (Breslow<1mm) apresentaram comprometimento nodal em 27,3% dos casos (cima da média da população (17%), observando-se também nestes casos associação com invasão linfática, ulceração, regressão, satelitose e invasão neural, além da presença de mitoses.

5.1 CICLINA D1

O ciclo celular apresenta duas **fases funcionais**: fase S (síntese) onde ocorre a duplicação do ácido desoxiribonucleico (DNA) e fase M (mitose) onde ocorre a separação de duas células filhas. Precedendo estas duas fases estão duas **fases preparatórias**: G1 (“Gap” 1 ou intervalo 1) que antecede a fase S e G2 (“Gap” 2 ou

intervalo 2) que antecede a fase M. A sequência dos eventos do ciclo celular é controlada por fatores extra e intracelulares (ALBERTS et al. 2002a).

A descoberta genética de fatores que induzem a progressão do ciclo celular em leveduras em divisão e de uma atividade que induz a mitose em ovos de rãs levaram a purificação de proteínas e a caracterização da primeira quinase dependente de ciclina (CDK), a CDK2. Outros estudos em invertebrados marinhos levaram a descoberta de uma proteína instável com níveis flutuantes durante o ciclo celular que foi chamada de ciclina. Ciclinas e as CDKs foram então rapidamente identificadas desde fungos até mamíferos e se mostraram como reguladoras do ciclo celular.

O complexo ciclina D1/CDK4 fosforila a proteína supressora de tumor pRb, promovendo a liberação do fator transcricional E2F capaz de ativar genes responsáveis para progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular.

Estudos experimentais demonstraram a participação da ciclina D1 na indução de tumores em camundongos transgênicos e na transformação de células em cultura. Alterações relacionadas à ciclina D1 e neoplasias, como adenomas de paratireoide e linfomas de células B (onde se descreve rearranjo gênico no locus da ciclina D1), certos casos de carcinoma escamo celular, câncer de mama, fígado e esôfago (onde se verificou amplificação de super-expressão do gene da ciclina D1), adenocarcinomas de cólon e tumores de bexiga, bem como carcinomas escamo celulares (relacionados com baixa ou perda da amplificação do gene), tem sido descritos. (GEORGIEVA et al. 2001; COQUERET 2002).

O papel da ciclina D1 no desenvolvimento, progressão e prognóstico de melanomas é controverso.

GEORGIEVA et al. (2001) não encontraram diferença significativa na expressão de ciclina D1 entre lesões melanocíticas benignas e malignas, observando algum nível de ciclina D1 em 46% dos nevos estudados. Este achado contrasta com os de FLORENES et al. (2002) que em seu estudo demonstrou imunoreatividade negativa para ciclina D1 nos 10 nevos benignos estudados, INOHARA et al. (1996), ALONSO et al. (2004) que também não observaram ciclina D1 em nenhum nevo melanocítico de seus estudos. RAMIREZ et al. (2005) verificaram que o nível de ciclina D1 é maior em melanomas primários comparados com nevos melanocíticos. LIMA JÚNIOR (2006) verificaram que em 12 nevos melanocíticos intradérmicos observou-se positividade para ciclina D1 em 4 casos (25%). E, quando comparados à melanomas primários sua expressão foi significativamente menor.

O presente estudo não incluiu em sua análise lesões melanocíticas maduras (“benignas”), porém reforça a ideia de que ciclina D1 é, sem dúvida, uma proteína chave no estudo de neoplasias como melanoma cutâneo.

ALONSO et al. (2004) confirmaram a observação de que ciclina D1 está aumentada em melanomas e, na fase radial de crescimento, ocorre aumento de sua expressão, diminuindo ao longo da derme reticular, observada na fase vertical de crescimento do melanoma. Os dados de SAUTER et al. (2002) são consistentes com estes achados.

HSIEH (2008) verificou expressão nuclear por imuno-histoquímica para ciclina D1 em melanoma acral lentiginoso em 61,5% dos 26 casos estudados e concluiu que não houve diferença estatisticamente significativa em relação a ulceração e à espessura do tumor (delgados e espessos, considerando Breslow menor ou maior que 1mm, respectivamente). SÁ (2005), que verificou positividade para

ciclina D1 em 16% dos melanomas primários estudados (n=125) sendo que foi significativamente mais expressa nos melanomas *in situ* e finos.

Acredita-se que as variações do microambiente do melanoma *in situ* comparado com o invasivo podem promover diferenças na expressão de ciclina D1. Além disso, pode ser devido, também, a variedade de proteínas ou outros fatores produzidos nas células próximas à membrana basal.

LIMA JÚNIOR (2006) ao comparar os tipos histológicos e a profundidade de invasão do melanoma primário observaram que a positividade de ciclina D1 diminuiu significativamente à medida que o tumor aumentou sua espessura. Esta relação inversa entre expressão de ciclina D1 e espessura do tumor se mostrou estatisticamente significativa em relação à metástase em LNS, que segundo os autores, sugeria a possibilidade da existência de uma relação inversa entre a expressão de ciclina de D1 e a progressão do tumor.

Estas controvérsias envolvendo a ciclina D1 e o melanoma cutâneo despertou o interesse dos autores em analisar sua expressão nas células neoplásicas de melanomas primários e correlacionar os achados com possíveis alterações gênicas e com outras proteínas do ciclo celular na tentativa de se verificar o real valor prognóstico em relação à metástase nodal, especialmente em LNS.

Neste estudo foi possível a análise da expressão de ciclina D1 em 149 casos, dos quais 32,2% (n=48) foram positivos. Não se observou diferença entre expressão de ciclina D1 (positiva e negativa) em relação à espessura do tumor (Breslow), porém quando se analisou isoladamente os casos em que houve expressão positiva de ciclina D1 observou-se uma relação direta e crescente entre a expressão de ciclina D1 e a profundidade do tumor. Não se observou diferença estatisticamente significativa

entre a expressão de ciclina D1 e metástase em linfonodo sentinela. Da mesma forma RAMIREZ et al. (2005) encontraram que o nível de ciclina D1 de todos os melanomas primários não se correlacionou com presença de metástases e FLORENES et al. (2002) verificaram que ciclina D1 não desempenha um papel importante na progressão do tumor.

A ciclina D1 é codificada pelo gene CCN1 localizado no cromossomo 11q13.

A técnica de hibridização fluorescente in situ (fluorescence in situ hybridization - FISH) foi desenvolvida na década de oitenta, utilizando sondas fluorescentes que se ligam às partes do cromossomo a que eles apresentam um elevado grau de complementaridade de sequência. É uma técnica citogenética usada para detectar e localizar sequências de DNA em cromossomos que podem estar ausentes, presentes ou alteradas.

Em seu estudo SUI et al. (2009) compararam as técnicas de imuno-histoquímica (IHQ) e FISH para o marcador Her-2 em câncer de mama com objetivo de investigar o índice de concordância entre os dois métodos, concluindo que a IHQ deve ser usada primeiro para se determinar o estado de Her-2 e nos casos negativos e de alto grau com marcação IHQ fraca seriam suplementados pela técnica de FISH, buscando aumentar a sensibilidade para indicação do tratamento com Herceptin.

YAMAURA et al. (2005) verificaram amplificação do gene da ciclina D1 por FISH em 2 dos 8 casos de melanoma acral “in situ” e em 4 dos 9 casos de suspeita histológica de melanoma acral “in situ”, sugerindo que a amplificação do gene da ciclina D1 representaria uma fase de progressão muito inicial do melanoma acral.

ABÁSULO et al. (2012) verificaram ganho do gene CCDN1 em 27 casos de melanoma (37%) considerando que juntamente com outros genes (RREB1, MYB e

CEP-6) formaria uma ferramenta útil na diferenciação de lesões melanocíticas benignas e melanoma.

No presente estudo foi utilizada a técnica de FISH de duas cores, aplicando-se uma sonda para região de banda 11q13 (gene *CCND1*, responsável pela ciclina D1) de espectro laranja e outra sonda para reconhecimento do cromossomo 11 (centrômero) de espectro verde. Os sinais de FISH foram observados através do microscópio triocular com fluorescência de mercúrio (Olympus® 30 BX41-FL-III) equipado com filtro de banda e as imagens tricolores foram capturadas usando um sistema de imagem digital. Os sinais verde (centrômero do cromossomo 11) e vermelho (gene *CCND1*) foram contados nas células neoplásicas quando presentes em pelo menos 50 células ou mais em cada amostra do TMA. Células neoplásicas apresentando dois sinais verdes e dois sinais vermelhos foram consideradas normais. Nas células em que se observou dois sinais verdes e mais de dois sinais vermelhos, quando a razão gene/centrômero foi menor que 2 foi considerado ganho e, quando maior que 2, amplificação. Polissomia foi considerada quando houve aumento tanto do gene quanto do centrômero com razão menor que 1.

Foi possível análise da expressão de FISH em 122 casos. 102 casos apresentaram expressão normal (83,6%). Em 9 casos observou-se amplificação (7,3%), em 9 casos polissomia (7,3%) e em 2 casos observou-se ganho (1,6%).

No presente estudo não houve relação estatisticamente significativa entre alterações genômicas envolvendo o gene *CCND1* e a espessura do tumor (Breslow), bem como metástase em LNS.

Dos 25 casos de melanoma acral foi possível avaliar o gene da ciclina D1 por FISH em 20 deles, sendo que em 4 casos observou-se amplificação do gene da ciclina D1.

Nos casos em que se observou alterações do gene da ciclina D1 (amplificação, ganho ou polissomia) não houve uma correlação direta com a ausência ou a presença de expressão nuclear de ciclina D1 evidenciada por imunohistoquímica. Este achado sugere que mesmo alterado, o gene CCND1, é capaz de sinalizar a produção da ciclina D1. Em adição, não foram detectados casos de perda do gene da ciclina D1. Estudos moleculares envolvendo m-RNA poderiam complementar estes achados.

5.2 CDK 4

Foi possível analisar a expressão de CDK4 em 150 casos. Em 16 casos não houve expressão citoplasmática de CDK4 e em 25 casos observou-se marcação citoplasmática fraca, sendo, então, considerados casos negativos. Portanto, a expressão de cdk4 foi considerada positiva em 72,6% dos casos. WANG et al. (1996) observaram marcação forte intracitoplasmática em cinco dos 19 casos estudados de melanoma primário e marcação nuclear em 8 casos, dos quais dois também apresentaram marcação intracitoplasmática. BACHMANN et al. (2004) encontraram em seu estudo marcação nuclear em 96% dos casos e, citoplasmática em 97%, sem relação estatisticamente significativa com relação a outros marcadores como ciclina D1 e pRb. Alguns autores relatam que em poucos casos de melanoma esporádico pode haver super-expressão do gene que codifica cdk4 (CZAJKOWSKI et al. 2002).

Não se observou relação estatisticamente significativa com relação a expressão de CDK4 e tipo histológico, bem como espessura do tumor ou metástase em linfonodo sentinela.

MARIDOR et al. (1993) reportaram que o transporte de ciclina A do citoplasma para o núcleo requereria a formação do complexo com a CDK. Embora outras explicações não pudessem ser excluídas, os autores especularam que esta interpretação implicaria em interações específicas entre complexos ciclina/CDK e outras proteínas. No presente estudo pode-se observar marcação nuclear para CDK4 em 63 casos (42%). Destes casos, 14 (22%) não expressaram ciclina D1, dessa forma o complexo CDK4/ciclina D1 parece não explicar completamente o transporte desta proteína para o núcleo da célula. Em 5 casos observou-se marcação nuclear para CDK4 com ausência de expressão citoplasmática e os demais apresentaram marcação moderada e forte no citoplasma, fazendo supor que outros mecanismos possam estar envolvidos nesta forma de expressão de CDK4.

WANG et al. (1996) definiram que uma possível razão para a super-expressão citoplasmática de CDK4 seria a produção desbalanceada de CDK4 intracitoplasmática comparada à ciclina D1. No presente estudo foi possível analisar em conjunto ciclina D1 e CDK4 em 147 casos, dos quais 75 apresentaram expressão de CDK4 citoplasmática sem expressar ciclina D1 nuclear (70,1%), compatível com a suposição de WANG et al. (1996). Porém, em 29,9% (n=32) destes casos houve expressão simultânea de CDK4 citoplasmática e ciclina D1 nuclear. Em sua revisão COQUERET (2002) coloca que os níveis de CDK permanecem constantes através do ciclo celular e que é a expressão de ciclina que varia de acordo com os períodos transcricional e pós-transcricional.

No presente estudo não se observou uma relação estatisticamente significativa entre a expressão de cdk4 e a profundidade de invasão tumoral (Breslow). GEORGIEVA et al. (2001) demonstraram positividade de cdk4 uniforme em todas as lesões melanocíticas sem diferenças significativas entre nevo e melanomas com espessuras variadas (GEORGIEVA et al. 2001).

Não houve relação estatisticamente significativa entre a positividade de cdk4 em melanoma primário e o desenvolvimento de metástases em linfonodo sentinela. Da mesma forma agrupando-se os casos positivos para ciclina D1 e CDK4 e negativos para os mesmos marcadores não se observou relação estatisticamente significativa em relação à metástase em LNS.

Parece que CDK4 não exerce um importante papel na progressão do melanoma cutâneo. Porém, investigações mais aprofundadas do mecanismo de síntese intracelular e o transporte de CDK4 para o núcleo devem ser realizadas para se verificar o quanto esta proteína está envolvida na progressão do ciclo celular em melanomas cutâneos.

5.3 CICLINA E

A ciclina E é expressa em células normais durante a transição da fase G1 tardia para a fase S inicial do ciclo celular. O complexo formado pela ciclina E e CDK2 tem a capacidade de fosforilar a proteína p27Kip1, marcando-a para degradação, liberando a ciclina D e promovendo a expressão da ciclina A, que será necessária na fase S do ciclo celular. Além disso, o complexo ciclinaE-CDK2 é

capaz de fosforilar a proteína do retinoblastoma, liberando E2F e facilitando a entrada na fase S do ciclo celular.

O acúmulo de ciclina E foi considerado como um contribuinte para proliferação celular e pior prognóstico em câncer de mama, estômago e colo retal (DONNELLAN et al. 1999) e possivelmente em melanoma (TANG et al. 1999). KEYOMARSI et al. (1994) observaram super-expressão de ciclina E em células de tumor de mama que parecia ter relação com a agressividade e estagio do tumor.

No presente estudo foi possível analisar a expressão em 152 casos, considerando-se positiva a marcação nuclear acima de 5% das células tumorais. Em 117 casos não houve expressão de ciclina E e nos 35 casos restantes não houve diferença estatisticamente significativa em relação a espessura de Breslow. Porém, observa-se maior número de casos com expressão positiva em melanomas mais espessos (>2mm). BALES et al. (1999) verificaram em um grupo de 21 pacientes, que o aumento da concentração de ciclina E estava associada à melanomas espessos. E, segundo ALEKSEENKO et al. (2012) não houve correlação estatisticamente significativa entre expressão de ciclina E e espessura do tumor.

No presente estudo foi possível analisar a expressão conjunta de ciclina D1 e ciclina E em 148 casos, observando-se que em 78 casos as duas proteínas foram negativas (52,7%) e em 6% (9 casos) foram ambas positivas. Em relação aos casos em que houve expressão positiva para ciclina E observa-se uma tendência direta a menor positividade de ciclina D1, e o inverso também pode ser observado. Uma importante conclusão do trabalho de GENG et al. (1999) foi que uma vez que a ciclina E se torna ativada a ciclina D1 é provavelmente dispensada da progressão do ciclo celular. No presente estudo estas relações não se mostraram estatisticamente

significativas. Não se observou relação estatisticamente significativa em relação à metástase em LNS e a expressão de ciclina E.

5.4 CDK2

Embora a CDK2 seja super-expressa em muitas linhagens de células tumorais, o papel da CDK2 no desenvolvimento de câncer é controverso. A maioria dos estudos focam sua participação na regulação do ciclo celular. PENG et al. (2016) demonstram um papel crítico da CDK2 na transformação celular e que sua presença é necessária para manter o fenótipo maligno de células do melanoma, GEORGIEVA et al. (2001) demonstraram aumento significativo na expressão de ciclina E e CDK2 em metástases de melanoma comparados a nevos e melanomas de diferentes espessuras.

No presente estudo foi possível analisar a expressão de CDK2 em 155 casos. Em 148 casos observou-se marcação leve, moderada e intensa. Dos 13 casos negativos, a ausência de marcação foi observada em 5 casos e os demais apresentavam marcação citoplasmática fraca. Apesar de não haver relação estatisticamente significativa em relação à expressão de CDK2 e a espessura de Breslow, quando se analisam os casos positivos observa-se um aumento gradativo da expressão positiva em relação à invasão do tumor. Foi possível analisar a expressão conjunta de Ciclina E e CDK2 em 152 casos, dos quais 34 expressaram positividade para ambas proteínas. Destes, 10 apresentaram metástase em LNS ($p=0,86$). Não houve relação estatisticamente significativa em relação a expressão de CDK2 e metástase em LNS.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu a análise de 157 pacientes com melanoma primário que foram submetidos à linfadenectomia seletiva (linfonodo sentinela) e o estudo da expressão das proteínas controladoras do ciclo celular: Ciclina D1, CDK4, Ciclina E e CDK2 por estudo imuno-histoquímico. Demonstrando que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão destas proteínas nos melanomas cutâneos primários com e sem metástases em linfonodos sentinela.

Através da hibridização “in situ” por fluorescência (FISH) foi possível analisar o gene da ciclina D1 (CCDN1) nos melanomas primários e demonstrar que nesta amostra não houve relação entre alterações deste gene (amplificação, ganho e polissomia) em melanomas cutâneos com e sem metástase em linfonodo sentinela.

A análise de variáveis sociodemográficas, clínicas e histológicas permitiu concluir que a invasão linfática e a ulceração se mostraram de maneira estatisticamente significativa em relação a metástase em linfonodo sentinela. Das demais variáveis nenhuma delas se mostrou estatisticamente significativa em relação a metástase em linfonodo sentinela.

Este estudo demonstra que é possível utilizar a técnica de tissue microarray para estudos moleculares e de citogenética e que novos estudos podem ser realizados com esta casuística.

Pode ser que outros fatores não relacionados à progressão do ciclo celular exerçam um importante papel no comportamento biológico do melanoma e sua capacidade de disseminação metastática. Certamente a realização de outros estudos contribuirá para elucidar o papel biológico destas proteínas em lesões melanocíticas da pele.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abásolo A, Vargas MT, Ríos-Martín JJ, Trigo I, Arjona A, González-Cámpora R. Application of fluorescence in situ hybridization as a diagnostic tool in melanocytic lesions, using paraffin wax-embedded tissues and imprint-cytology specimens. **Clin Exp Dermatol** 2012; 37:838-43.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science; 2002a. The cell cycle and programmed cell death; p.983-1026.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science; 2002b. Cancer; p.1313-62.

Albino AP, Reed JA, McNutt NS. Molecular biology of cutaneous malignant melanoma. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg AS, editors. **Cancer: principles and practice of oncology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Raven; 1997. p.1935-46.

Alekseenko A, Wojas-Pelc A, Lis GJ, et al. Expression of cyclins A and E in melanocytic skin lesions and its correlation with some clinicopathologic features. **Folia Histochem Cytobiol** 2012; 50:263-9.

Alonso SR, Ortiz P, Pollan M, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles a tissue microarray-based Study. **Am J Pathol** 2004; 164:193-203.

Armstrong B. Epidemiology of cutaneous melanoma and current trends. In: Thompson JF, Morton DL, Kroon BBR, editors. **Textbook of melanoma**. London: Martin Diniz; 2004. p.65-80.

Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Altered expression of cell cycle regulators Cyclin D1, p14, p16, CDK4 and Rb in nodular melanomas. **Int J Oncol** 2004; 25:1559-65.

Bakos L, Wagner M, Bakos RM, et al. Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in Southern Brazil. **Int J Dermatol** 2002; 41:557-62.

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. **J Clin Oncol** 2001; 19:3635-48.

Bales ES, Dietrich C, Bandyopadhyay D, Schwahn DJ, Xu W, Didenko V, Leiss P, Conrad N, Pereira-Smith O, Orenko I, Medrano EE. High levels of expression of p27KIP1 and cyclin E in invasive primary malignant melanomas. **J Invest Dermatol** 1999; 113:1039-46.

Bartkova J, Lukas J, Guldberg P, et al. The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. **Cancer Res** 1996; 56:5475-83.

Bataille V. Genetic epidemiology of melanoma. **Eur J Cancer** 2003; 39:1341-7.

Blessing K, McLaren KM, McLean A, Davidson P. Thin malignant melanomas (less than 1.5 mm) with metastasis: a histological study and survival analysis. **Histopathology** 1990; 17:389-95.

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

Bury J, Cross S. Molecular biology in diagnostic histopathology: Part I – The cell cycle. **Curr Diag Pathol** 2003 9:266-75.

Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. **Cancer** 1977; 39:456-66.

Chammas R. Melanoma cutâneo. In: Ferreira CG, Rocha JC, editores. **Oncologia molecular**. 2^a ed. São Paulo: Atheneu; 2011. p.231-40.

Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. **Cancer Res** 1969; 29:705-27.

Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. **Gene** 2002; 299:35-55.

Czajkowski R, Drewa T, Wozniak A, Krzyzyska-Malinowska E. Cell cycle in sporadic melanoma. **Int J Dermatol** 2002; 41:550-6.

Dawson-Saunders B, Trapp RG. Research questions about two separate on independent groups. In: **Basic and clinical biostatistics**. New York: McGraw-Hill; 2004.; p.134-61.

Donnellan R, Chetty R. Cyclin E in human cancers. **FASEB J** 1999; 13:773-80.

Duprat JP, Silva DC, Coimbra FJ, et al. Sentinel lymph node biopsy in cutaneous melanoma: analysis of 240 consecutive cases. **Plast Reconstr Surg** 2005; 157:1944-51.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7^a ed. New York: Springer-Verlag, 2010. Skin; p.299-344.

Florenes VA, Faye RS, Maeldandsmo GM, Nesland JM, Holm R. Levels of cyclin D1 and D3 in malignant melanoma: deregulated cyclin D3 expression is associated with poor clinical outcome in superficial melanoma. **Clin Cancer Res** 2000; 6:3614-20.

Geng Y, Whoriskey W, Park MY, et al. Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. **Cell** 1999; 97:767-77.

Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. **J Clin Pathol** 2001; 54:229-35.

Gerbaud L, Lejeune ML, Abou-Samra T, et al. Epidemiological survey of melanoma in auvergne region (France): is there an increased incidence in auvergne? **Eur J Epidemiol** 2003; 18:331-5.

Green CL, Khavari PA. Targets for molecular therapy of skin cancer. **Semin Cancer Biol** 2004; 14:63-9.

Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. **Am J Pathol** 2001; 158:1245-51.

Hsieh R. **Expressão da proteína p16, ciclina D1, CDK4 e proteína do retinoblastoma no melanoma acral lentiginoso.** São Paulo, 2008. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]

Inohara S, Kitagawa K, Kitano Y. Expression of cyclin D1 and p53 protein in various malignant skin tumors. **Dermatology** 1996; 192:94-8.

Jakub JW, Pendas S, Reintgen DS. Current status of sentinel lymph node mapping and biopsy: facts and controversies. **Oncologist** 2003; 8:59-68.

Karjalainen JM, Eskelinen MJ, Kellokoski JK, Reinikainen M, Alhava EM, Kosma VM. p21 WAF1/CIP1 expression in stage I cutaneous malignant melanoma: its relationship with p53, cell proliferation and survival. **Br J Cancer** 1999; 79:895-902.

Katalinic A, Kunze U, Schafer T. Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumor stages and localization (epidemiology of skin cancer). **Br J Dermatol** 2002; 149:1200-6.

Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ, Pardee AB. Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. **Cancer Res** 1994; 54:380-5.

Kim CJ, Reintgen DS, Yeatman TJ. The promise microarray technology in melanoma care. **Cancer Control** 2002; 9:49-53.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. **Int J Cancer** 2001; 92:276-84.

Landman G, Muller H, Fillus Neto J, et al. Consenso para o laudo anatomopatológico do melanoma cutâneo. **Acta Oncol Bras** 2003; 23:504-10.

Lima Junior CLH. **Modulação da adesão e ciclo celular: influência no desenvolvimento de micrometástases em linfonodo sentinela de melanoma cutâneo**. São Paulo, 2006. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Mackie RM, Bray CA, Hole DJ, et al. Incidence of and survival from malignant melanoma in Scotland: an epidemiological study. **Lancet** 2002; 360:587-91.

Maelandsmo GM, Holm R, Fodstad O, Kerbel RS, Flørenes VA. Cyclin kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in malignant melanoma: reduced expression in metastatic lesions. **Am J Pathol** 1996; 149:1813-22.

Maridor G, Gallant P, Golsteyn R, Nigg EA. Nuclear localization of vertebrate cyclin A correlates with its ability to form complexes with cdk catalytic subunits. **J Cell Sci** 1993; 106 (Pt 2):535-44.

McMasters KM, Sondak VK, Lotze MT, Ross MI. Recent advances in melanoma staging and therapy. **Ann Surg Oncol** 1999; 6:467-75.

Morton DL, Wen DR, Wong JH, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early melanoma. **Arch Surg** 1992; 127:392-9.

Pacifico MD, Grover R, Richman P, Daley F, Wilson GD. Validation of tissue microarray for the immunohistochemical profiling of melanoma. **Melanoma Res** 2004; 14:39-42.

Parmiter RH, Nowell PC. Cytogenetics of melanocytic tumors. **J Invest Dermatol** 1993; 100:2545-85.

Peng C, Zeng W, Su J, Kuang Y, He Y, Zhao S, Zhang J, Ma W, Bode AM, Dong Z, Chen X. Cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) is a key mediator for EGF-induced cell transformation mediated through the ELK4/c-Fos signaling pathway. **Oncogene** 2016; 35:1170-9.

Ramirez JA, Guitart J, Rao MS, Diaz LK. Cyclin D1 expression in melanocytic lesions of the skin. **Ann Diagn Pathol** 2005; 9:185-8.

Rane SG, Cosenza SC, Mettus RV, Reddy EP. Germ line transmission of Cdk4R24C mutation facilitates tumorigenesis and escape from cellular senescence. **Mol Cell Biol** 2002; 22:644-56.

Reed JA, Loganzo F Jr, Shea CR, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. **Cancer Res** 1995; 55:2713-8.

Riabowol K, Draetta G, Brizuela L, Vandre D, Beach D. The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. **Cell** 1989; 57:393-401.

Rizos H, Becker TM, Holland EA. Cell cycle regulation in melanocyte. In: Thompson JF, Morton DL, Kroon BBR, editors. **Textbook of melanoma**. London: Martin Diniz; 2004. p.13-24.

Robertson G, Coleman A, Lugo TG. A malignant melanoma tumor supressor on human chromosome 11. **Cancer Res** 1996; 56:4487-92.

Sá BCS. **Criação de “tissue array” de melanomas cutâneos extensivos superficiais para estudo imunoistoquímico de fatores ligados à proliferação e apoptose celular**. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Saha S, Dan AG, Bilchik AJ, et al. Historical review of lymphatic mapping in gastrointestinal malignancies. **Ann Surg Oncol** 2004; 11:245S-9S.

Sauter ER, Yeo UC, von Stemm A, et al. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. **Cancer Res** 2002; 62:3200-6.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev** 1999; 13:1501-12.

Slominski A, Wortsman J, Nickoloff B, et al. Molecular pathology of malignant melanoma. **Am J Clin Pathol** 1998; 110:788-94.

Slominski A, Wortsman J, Carlson AJ, Matsuoka LY, Balch CM, Mihm MC. Malignant melanoma. **Arch Pathol Lab Med** 2001; 125:1295-306.

Soini Y, Puhakka A, Kahlos K, et al. Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or expression of VEGF, FLK1 or FLT1. **Histopathology** 2001; 39:179-86.

Su YA, Trent JM. Genetics of cutaneous malignant melanoma. **Cancer Control** 1995; 2:392-7.

Sui W, Ou M, Chen J, Wan Y, Peng H, Qi M, Huang H, Dai Y. Comparison of immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) assessment for Her-2 status in breast cancer. **World J Surg Oncol** 2009;7:83.

Tang L, Li G, Tron VA, Trotter MJ, Ho VC. Expression of cell cycle regulators in human cutaneous malignant melanoma. **Melanoma Res** 1999; 9:148-54.

Wainstein AJA, Belfort FA. Conduta para o melanoma cutâneo management of cutaneous melanoma - Artigo de Atualização. **Rev Col Bras** 2004; 31: 204-14.

Wang YL, Uhara H, Yamazaki Y, Nikaido T, Saida T. Immunohistochemical detection of CDK4 and p16INK4 proteins in cutaneous malignant melanoma. **Br J Dermatol** 1996; 134:269-75.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell** 1995; 81:323-30.

Yamaura M, Takata M, Miyazaki A, Saida T. Specific dermoscopy patterns and amplifications of the cyclin D1 gene to define histopathologically unrecognizable early lesions of acral melanoma in situ. **Arch Dermatol** 2005; 141:1413-8.

Yudd AP, Kempf JS, Goydos JS, Stahl TJ, Feinstein RS. Use of sentinel node lymphocintigraphy in malignant melanoma. **Radiographics** 1999; 19:343-56.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 11 de abril de 2013.

A

Dra. Isabela Werneck da Cunha.

Aluno: Cristiano Luiz Horta de Lima Junior (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1749/13

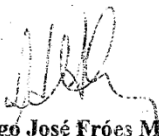
“Estudo da expressão imunoistoquímica de ciclina D1, CDK4, Cyclina E, CDK2 e estudo da hidridização in situ por fluorescência em melanoma cutâneo primário de pacientes submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 12/03/2013, **aprovaram** a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Cutânea (Núcleo de Câncer de Pele e Dermatologia) do Hospital A.C. Camargo.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa