

**PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO *BRAF* V600E, *NRAS* Q61L e
KIT V559A E PADRÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA
DAS PROTEÍNAS *BRAF* V600E, PTEN e p53 EM MELANOMAS
CUTÂNEOS PRIMÁRIOS TRATADOS NO HOSPITAL
HAROLDO JUAÇABA-ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS
CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E COM FOTOTIPO DA PELE**

MARCIO RIBEIRO STUDART DA FONSECA

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

Área de concentração: Oncologia

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto
Soares**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Deysi Viviana
Tenazoa Wong**

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Studart-da-Fonseca, Marcio Ribeiro

Prevalência da mutação BRAF V600E, NRAS Q61L E KIT V559A e padrão da expressão imunoistoquímica das proteínas BRAF V600E, PTEN e p53 em melanomas cutâneos primários tratados no Hospital Haroldo Juaçaba- associação com parâmetros clínicos, histopatológicos e com fototipo da pele / Marcio Ribeiro Studart da Fonseca – São Paulo, 2018.

163p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. Melanoma/Melanoma. 2. Biomarcadores/Biomarkers. 3. Neoplasias Cutâneas/Skin Neoplasms. 4. Fatores Prognósticos/Prognostic Factors. 5. Etnicidade/Ethnicity. 6. Pigmentação da Pele/Skin Pigmentation. 7. Análise de Sobrevida/Survival analysis. 8. Proteínas Proto-Oncogênicas B-raf/Proto-Oncogene Proteins B-raf. 9. Proteína Supressora de Tumor p53/Tumor Suppressor Protein p53. 10. Proteínas Proto-Oncogênicas c-kit/Proto-Oncogene Proteins c-kit. 11. Imuno-Histoquímica/ Immunohistochemistry.

“O Brasil já é a maior nação neolatina, pela magnitude populacional e começa a sê-lo também por sua criatividade artística e cultural. Precisa agora sê-lo no domínio da tecnologia da futura civilização, para se fazer uma potência econômica, de progresso auto-sustentado. Estamos nos preparando para florescer amanhã uma nova civilização, mestiça e tropical, orgulhosa de si mesma. Mais alegre, porque mais sofrida. Melhor, porque incorpora em si mais humanidade. Mais generosa, porque aberta à convivência com todas as raças e culturas e porque assentada na mais mimosa província da Terra.”

Darcy Ribeiro, 2004

DEDICATÓRIA

A meu saudoso pai Evandro, filho amoroso, irmão prestativo, esposo devotado, pai apaixonado, tio atencioso, avô dedicado, amigo leal, professor respeitado e respeitador, médico benévolo e humano, homem benigno.

A minha mãe Bianca, fonte de minha vida, exemplo de mãe, irmã e esposa, padrão de mulher elegante e humilde, jóia preciosa de meu pai.

A minha esposa Karoline que a vida muito cedo me presenteou e desde muito cedo escolhi e confiei para ser minha esposa e mãe de meus filhos.

A meus filhos Marina, Marcio Filho e Catarina, verdadeiros presentes de Deus, fonte de estímulo para a vida, a quem dedico todo o meu esforço, exemplo e legado de vida.

Ao saudoso Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, exemplo de dedicação e esforço para muitos, fonte de inspiração para tantos, motivo de orgulho para todos.

AGRADECIMENTOS

A Deus Nosso Senhor pela vida e pela vocação,
Ao Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, meu orientador inicial, pelo exemplo, por acreditar no projeto e pelo incentivo
Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares que me adotou para ser seu orientando
A Prof. Dra Deysi Viviana Tenazoa Wong pela dedicação e atenção como co-orientadora
A Prof Dra. Maria do Perpétuo Socorro Saldanha da Cunha pela relevante contribuição técnica e incentivo
A Prof. Dra Isabelle Joyce de Lima Siva Fernandes por dedicação nas avaliações biomoleculares
Ao Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva pelo apoio na estatística
Ao Prof. Dr. Marcos Venício Alves Lima por sua contribuição no Dinter e constante incentivo
A Dra Renata Falcão pela contribuição nas avaliações biomoleculares
A Bibliotecária Larisse Macedo de Almeida por sua ajuda na obtenção de trabalhos e organização de referências bibliográficas
A Bibliotecária Suely Francisco por sua ajuda na formatação desta tese
Ao Prof. Dr. Markus Andret Cavalcante Giffoni pela confiança depositada no desenvolvimento conjunto do projeto PPSUS PPSUS PERFIL HISTOPATOLÓGICO E MOLECULAR DE MELANOMAS CUTÂNEOS NO ESTADO DO CEARÁ
Aos colegas do Serviço TOC do ICC - Tecido Ósseo Conectivo, em especial aos Drs. Marcos Vieira Fernandes e Irapuan Teles de Araújo Filho pela ajuda no acompanhamento dos pacientes portadores de melanoma
A Dra Josiane da Silva Quetz pela prestimosa ajuda no planejamento do projeto PPSUS PERFIL HISTOPATOLÓGICO E MOLECULAR DE MELANOMAS CUTÂNEOS NO ESTADO DO CEARÁ
A Alceu Machado de Sousa pela técnica na confecção dos blocos de *TMA*

A Francikeila Teixeira de Sousa pela ajuda junto aos prontuários
A Shirley Queiroz Pinheiro, a Manuela Cristina Silva Sales e a Veralúcia
Araújo Menezes por suas gratuitas contribuições na confecção de lâminas
A Nilson Bernardino Cosmo pela sua ajuda na separação e organização de
blocos de parafina e lâminas de histopatologia
A Karla Oliveira e Carolina Noronha, acadêmicas de medicina e bolsistas da
Iniciação Científica que me ajudaram neste projeto
A Dra Gislane Rocha Vasconcelos pelas Fotomicrografias
As instituições ICC e ACCamargo Cancer Center, duas casas onde muito
aprendi
A FUNCAP por prover meios e apoio financeiro para a realização através do
projeto de PPSUS

RESUMO

Studart-da-Fonseca MR. **Prevalência da mutação *BRAF* V600E, *NRAS* Q61L e *KIT* V559A e padrão da expressão imunoistoquímica das proteínas *BRAF* V600E, *PTEN* e *p53* em melanomas cutâneos primários tratados no Hospital Haroldo Juaçaba-associação com parâmetros clínicos, histopatológicos e com fototipo da pele.** São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: Melanoma cutâneo tem etiologia multifatorial. *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *PTEN* e *TP53* são importantes genes envolvidos na patogênese do melanoma. **Objetivo:** Caracterizar o perfil clinicopatológico e molecular do melanoma cutâneo primário no Estado do Ceará, Brasil. **Metodologia:** Dados demográficos, clínico-patológicos foram coletados. Fototipo da pele foi determinado conforme Fitzpatrick (1988) e elastose solar foi classificada de acordo com LANDI et al. (2006). Realizado rastreamento das mutações *BRAF* V600E, *NRAS* Q61L e *KIT* V559A por RT-PCR e imunoistoquímica para avaliação de *BRAF* V600E (mutada), *PTEN* e *p53*. **Resultados:** Nos 156 melanomas incluídos, sexo feminino, fototipo II e sítio tronco predominaram. Breslow foi maior que 4mm em 32,8% e ulceração ocorreu em 46,3% dos casos. Elastose solar foi moderada a severa em 31,8%. Mutação *BRAF* V600E foi detectada em 18,6% e nenhuma mutação *NRAS* e *KIT* foi detectada. Expressão de *BRAF* V600E, *PTEN* e *p53* ocorreram em 32,3%, 87% e 80%, respectivamente. Mutação *BRAF* V600E teve associação significativa com sítio, idade e expressão de *BRAF* V600E, mas não com a expressão de *PTEN*. A expressão de *p53* teve associação significativa com recidiva sistêmica. **Conclusão:** A prevalência da mutação *BRAF* V600E foi baixa comparada às populações caucasianas mais estudadas com diferenças no padrão do melanoma cutâneo mutado *BRAF* V600E. A expressão de *p53* foi mais prevalente do que a encontrada na literatura se apresentando como fator de bom prognóstico.

SUMMARY

Stuart-da-Fonseca MR. [Prevalence of the *BRAF V600E*, *NRAS Q61L* and *KIT V559A* mutations and immunohistochemical expression pattern of *BRAF V600E*, *PTEN* and *p53* proteins in primary cutaneous melanomas treated at Haroldo Juaçaba Hospital – association with clinical, histopathological and skin phototype parameters.] São Paulo; 2018. [Doctoral thesis-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Cutaneous melanoma has a multifactorial etiology. *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *PTEN* and *TP53* are important genes involved in the pathogenesis of melanoma. **Objective:** To characterize the clinical-pathological and molecular profile of primary cutaneous melanoma in the state of Ceará, Brazil. **Method:** Demographic and clinical-pathological data were collected. Skin phototype was determined according to Fitzpatrick (1988) and solar elastosis was classified according to LANDI et al. (2006). *BRAF V600E*, *NRAS Q61L* and *KIT V559A* mutation screening was performed by RT-PCR and immunohistochemistry to evaluate *BRAF V600E* (mutated), *PTEN* and *p53*. **Results:** Of the 156 assessed melanomas, female gender, phototype II and trunk tumor location predominated. Breslow was greater than 4mm in 32.8% and ulceration occurred in 46.3% of the cases. Solar elastosis was moderate to severe in 31.8%. The *BRAF V600E* mutation was detected in 18.6% and no *NRAS* and *KIT* mutations were detected. *BRAF V600E*, *PTEN* and *p53* expression occurred in 32.3%, 87% and 80% of cases, respectively. The *BRAF V600E* mutation was significantly associated with site, age and *BRAF V600E* expression, but not with *PTEN* expression. *p53* expression showed a significant association with systemic relapse. **Conclusion:** The *BRAF V600E* mutation prevalence was low when compared to the most frequently studied Caucasian populations, with differences observed in the mutated *BRAF V600E* cutaneous melanoma pattern. *p53* expression was more prevalent than that found in the literature, showing a good prognostic factor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Taxa de incidência e mortalidade por câncer (dez taxas mais elevadas) por sexo, EUA (1975-2013)	7
Figura 2	Taxa de incidência de cânceres selecionados por sexo, EUA (1975-2013)	7
Figura 3	Unidade melânica-epidérmica	13
Figura 4	Cor constitutiva vs cor facultativa	14
Figura 5	Estrutura da Eumelanina e Feomelanina	14
Figura 6	Índice ultravioleta na América do Sul.....	25
Figura 7	Cascatas de sinalização a partir do receptor de Tirosina quinase.....	32
Figura 8	As duas vias: Ras/Raf/MEK/ERK e Ras/PI3K/PTEN/Akt/Mtor...	38
Figura 9	Vias alteradas no melanoma	44
Figura 10	Fotomicrografia: melanoma cutâneo	68
Figura 11	Fotomicrografia: melanoma cutâneo com forte imunoexpressão citoplasmática de BRAF V600E	74
Figura 12	Fotomicrografia: melanoma cutâneo com forte imunoexpressão citoplasmática de PTEN.....	75
Figura 13	Fotomicrografia: melanoma cutâneo. Ausência de imunoexpressão de PTEN	75

Figura 14	Fotomicrografia: melanoma com forte imunexpressão nuclear de p53 em 100% das células tumorais	76
Figura 15	Sobrevida global - ocorrência de recidiva	95
Figura 16	Sobrevida global – porcentagem de expressão IHQ de p53.....	97
Figura 17	Sobrevida livre de recorrência - porcentagem de expressão IHQ de p53	99

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Fototipos de pele segundo Fitzpatrick.....	19
Quadro 2	Escore de Elastose solar	52
Quadro 3	Especificações dos ensaios de genotipagem TaqMan (CastPCR) utilizados no presente trabalho	57
Tabela 1	Características demográficas e clínicas	62
Tabela 2	Dados sobre tratamento e <i>follow up</i>	65
Tabela 3	Exame Anatomopatológico.....	69
Tabela 4	Resultados de mutações	72
Tabela 5	Resultados de Imuno-histoquímica	77
Tabela 6	Idade vs nível de instrução	79
Tabela 7	Idade vs sítio anatômico.....	80
Tabela 8	Idade vs metástase em trânsito na apresentação.....	81
Tabela 9	Idade vs status mutação <i>BRAF V600E</i>	81
Tabela 10	Idade vs expressão IHQ de <i>BRAF V600E</i>	82
Tabela 11	Sexo vs sítio anatômico.....	83
Tabela 12	Sexo vs status da mutação <i>BRAF V600E</i>	84

Tabela 13	Sexo vs expressão IHQ de BRAF V600E	84
Tabela 14	Fototipo vs status da mutação <i>BRAF</i> V600E	85
Tabela 15	Fototipo vs porcentagem de expressão IHQ de p53.....	85
Tabela 16	Fototipo vs infiltração linfocítica peritumoral.....	85
Tabela 17	Status da mutação <i>BRAF</i> V600E vs idade.....	86
Tabela 18	Status da mutação <i>BRAF</i> V600E vs sítio anatômico	87
Tabela 19	Status da mutação <i>BRAF</i> V600E vs expressão IHQ de BRAV V600E	87
Tabela 20	Expressão de BRAF V600E vs idade.....	88
Tabela 21	Expressão de BRAF V600E vs elastose agrupada.....	88
Tabela 22	Expressão de BRAF V600E vs sexo	89
Tabela 23	Expressão de BRAF V600E vs status da mutação <i>BRAF</i> V600E	89
Tabela 24	p53 vs sítio anatômico.....	90
Tabela 25	p53 vs infiltração linfocítica intratumoral.....	91
Tabela 26	p53 vs invasão vascular	91
Tabela 27	p53 vs linfonodo sentinela	92

Tabela 28	p53 vs fototipo	93
Tabela 29	p53 vs invasão perineural.....	94
Tabela 30	p53 vs recidiva sistêmica.....	94
Tabela 31	Parâmetros comparados vs p-valor.....	101
Tabela 32	Amostras vs % de expressão IHQ de p53.....	102
Tabela 33	Amostras vs ulceração na histopatologia	102
Tabela 34	Amostras vs estado na última consulta	102
Tabela 35	Características clínicas, demográficas e histopatológicas Melanomas com mutação <i>BRAF</i> V600E	107
Tabela 36	Comparação de Prevalência de Mutações.....	133

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
DEM	Dose Eritematosa Mínima
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Câncer
HHJ	Hospital Haroldo Juaçaba
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICC	Instituto do Câncer do Ceará
IHQ	Imunoistoquímica
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
RTK	Receptores de Tirosina-quinase
RT-PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
SEER	<i>US Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TK	Tirosina-Kinase; Tirosina-quinase
UVA	Raios Ultravioleta-Comprimento de Onda A
UVB	Raios Ultravioleta-Comprimento de onda B
UVC	Raios Ultravioleta-Comprimento de onda C
UVi	Índice de Radiação Ultravioleta
UVR	Radiação Ultra Violeta
vs	Versus

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Melanoma Cutâneo	1
1.2	A cor da pele, a melanina e o melanócito.....	11
1.3	Radiação ultra-violeta.....	21
1.4	Elastose solar	26
1.5	Biologia molecular no melanoma.....	29
1.6	A população brasileira e nordestina	45
2	OBJETIVOS	48
2.1	Objetivo Geral.....	48
2.2	Objetivos Específicos	48
3	MATERIAL E METODOLOGIA.....	49
3.1	Tipo de Estudo e Amostra	49
3.2	Aspectos Éticos	51
3.3	Crterios de Elegibilidade.....	51
3.4	Classificação e Graduação da Elastose Solar.....	52
3.5	Extração de DNA e Rastreamento de Mutações	53
3.6	Avaliação Imunoistoquímica para PTEN, p53 e BRAFV600E	57
3.7	Análise Estatística	59
4	RESULTADOS.....	60
4.1	Caracterização Demográfica e Clínica	60
4.2	Caracterização do Tratamento	63
4.3	Caracterização Anatomopatológica.....	67
4.4	Caracterização Biomolecular.....	70
4.5	Caracterização Imunoistoquímica	73
4.6	Associações Clínico-Patológicas e Biomoleculares	77
4.6.1	Idade	77

4.6.2	Sexo	83
4.6.3	Fototipo.....	84
4.6.4	Mutação V600E do gene <i>BRAF</i>	86
4.6.5	Expressão Imunoistoquímica de BRAF V600E	87
4.6.6	Expressão imunoistoquímica de PTEN	89
4.6.7	Expressão imunoistoquímica de p53.....	90
4.7	Análises de Sobrevida.....	94
4.8	Comparação entre as populações - ensaios válidos, inválidos e não realizados	99
4.9	Caracterização das Amostras Validadas na Pesquisa da Mutação <i>BRAFV600E</i>	103
4.10	Avaliação da casuística considerando apenas os melanomas invasivos.....	111
5	DISCUSSÃO	115
6	CONCLUSÃO	149
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150

ANEXO

Anexo 1 Pareceres do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

APÊNDICES

Apêndice 1 Ficha Fototipo

Apêndice 2 Ficha Clínica

Apêndice 3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Apêndice 4 Carta de Esclarecimento de uso de Material

Histopatológico Para Novo Projeto Perfil da Mutação de Braf E NRAS em Melanomas Cutâneos Tratados no Hospital Haroldo Juaçaba - Instituto do Câncer do Ceará

1 INTRODUÇÃO

1.1 MELANOMA CUTÂNEO

O melanoma é uma neoplasia maligna de etiologia multifatorial que resulta da interação de fatores do hospedeiro, genéticos e ambientais, sendo dentre estes, a exposição solar, o principal deles (LENS e DAWES 2004). Um estudo realizado na região Sul do Brasil identifica como aumento de risco para melanoma os seguintes fatores individuais: cabelos ruivos ou loiros, pele e olhos claros, presença de efélides, elevado número de nevos melanocíticos, presença de nevos displásicos e história de queimaduras solares (BAKOS et al. 2002). Esta neoplasia é muito mais frequente em indivíduos cuja exposição solar é muito mais recreacional do que laboral, como nos finais de semana e férias (THOMAS et al. 2010; MULLIKEN et al. 2012). A maioria dos estudos epidemiológicos apontam para exposição solar na infância como o maior fator de risco para o desenvolvimento de melanoma (LENS e DAWES 2004).

Embora o Melanoma Cutâneo represente em torno de 4% dos tumores da pele, ele é responsável por aproximadamente 79% das mortes por câncer de pele (JEMAL et al. 2008).

O termo melanoma provém do grego “*melas*” que significa escuro e “*oma*” que significa tumor (SCOLYER et al. 2011; REBECCA et al. 2012). Sua primeira descrição é atribuída a Hipócrates no século 5 AC. Sua

evidência mais antiga é a presença de metástases melanóticas de melanoma em esqueletos de múmias precolombianas de aproximadamente 2400 anos de idade em Chancay e Chingas no Peru descritos por Urteaga e Pack (1966) citado por REBECCA et al. 2012, p.2).

O termo “maligno” em relação ao melanoma como “melanoma maligno”, pode gerar confusão, uma vez que não existe nenhuma forma conhecida de melanoma benigno. O uso deste termo pode gerar dúvidas entre pacientes, familiares, estudantes de medicina e até mesmo entre médicos. O termo melanoma é bem estabelecido como lesão maligna devendo ser abandonado a associação do termo “maligno” ao melanoma (SCOLYER et al. 2011).

Melanomas podem surgir de quaisquer sítios anatômicos onde o melanócito está presente. Conforme JIMBOW et al. (1976), a origem dos melanócitos em mamíferos foi finalmente estabelecida em 1948 por Rawles. Melanócitos são originados na crista neural e estão presentes na pele, mucosas, leptomeninges, trato uveal e retina (JIMBOW et al. 1976). A pele é a mais frequente localização onde o melanoma se desenvolve a partir da malignização de melanócitos na epiderme. No entanto sítios menos comuns como coróide ocular, meninges, mucosa do trato gastrointestinal, respiratório e genitourinário podem também ser acometidas por melanoma (TSAO et al. 2012).

A distribuição anatômica dos melanomas cutâneos varia de acordo com o sexo. Homens apresentam melanomas no tronco e pescoço mais

frequentemente, enquanto mulheres apresentam melanomas nos membros inferiores (HALL et al. 1999; GARBE et al. 2000).

O padrão de exposição intensa e intermitente ao sol é atribuída ao maior risco de melanoma cutâneo. No entanto, embora a hipótese da “exposição intermitente” explique a elevada incidência de melanoma entre trabalhadores não expostos ao sol e a forte associação entre queimaduras solares e férias de verão com melanomas cutâneos, ela não explica na totalidade a heterogeneidade de padrões de incidência quando analisados por sítio anatômico e idade (CURTIN et al. 2005; KVASKOFF et al. 2015). De fato, embora haja um consenso que a exposição solar seja o fator principal para o desenvolvimento do melanoma cutâneo, parece paradoxal o fato de melanomas cutâneos ocorrerem frequentemente nas áreas de pele cobertas e que trabalhadores expostos ao sol (“*outdoors*”) tenham taxas de incidência da doença menores que os trabalhadores não expostos ao sol (“*indoors*”) (WHITEMAN et al. 2003).

WHITEMAN et al. (1998) num estudo de expressão de p53 em melanomas propuseram o modelo de “vias divergentes” para explicar a malignização no melanoma cutâneo. Por este modelo, indivíduos sem tendência a proliferação melanocítica necessitariam de exposição solar crônica e apresentariam melanomas em áreas expostas ao sol como na face enquanto que indivíduos com elevada tendência herdada para proliferação melanocítica, caracterizada clinicamente pela elevada contagem de nevos, necessitariam de exposição menos intensa a luz solar para os próprios fatores do hospedeiro iniciarem o processo de malignização. Estes

tenderiam a desenvolver melanomas em sítios de “instabilidade da população melanocítica” como no tronco (WHITEMAN et al. 2003). Para provar sua teoria WHITEMAN et al. (2003) estudaram melanomas cutâneos da cabeça e pescoço e tronco observando que na região da cabeça e pescoço os indivíduos apresentavam significativamente mais ceratoses solares, menor contagem de nevos e maior tendência à exposição ocupacional ao sol, contrastando com indivíduos portadores de melanomas cutâneos de mesmo tipo histológico no tronco. De modo semelhante, CARLI e PALLI (2003) enfatizaram as mesmas diferenças encontradas entre portadores de melanomas de cabeça e pescoço (mais idosos e com menor contagem de nevos) e tronco entre os dados coletados no estudo do Grupo Multidisciplinar Italiano de Melanoma.

Devida a sua crescente incidência e a conseqüente mortalidade, o melanoma representa um problema de saúde pública (LENS e DAWES 2004; DAVIES e SAMUELS 2010; SCHMERLING et al. 2011). Padrões globais de incidência e a especificação de todas essas variáveis são de difícil interpretação e refletem provavelmente uma complexa mistura que varia segundo localização geográfica, raça e etnia (BAKOS et al. 2002).

Dados do *Surveillance, Epidemiology and End Results-SEER* indicam que o melanoma foi a neoplasia maligna que mais cresceu em incidência nos EUA entre os anos de 1973 a 1997 entre homens e mulheres. Da mesma forma, dados do *Scottish Melanoma Group* durante o período de 1979 a 1998 mostraram uma crescente incidência de melanoma para ambos os sexos (LENS e DAWES 2004). Avaliando especificamente o período de

1990 a 1994 no SEER database, HALL et al. (1999) observaram um aumento na incidência do melanoma localizado em mulheres de 133,7% e em homens de 233,8% nos EUA. Os Melanomas com disseminação regional ou sistêmica cresceram naquele período 75% entre os homens e 23,5% entre as mulheres (HALL et al. 1999), achados semelhantes na análise de JEMAL et al. (2000). Embora houvesse discussão se o aumento da incidência do melanoma devia-se somente ao diagnóstico precoce de lesões de crescimento indolente, alguns estudos sugeriam que nos EUA estava existindo um verdadeiro aumento na incidência desta neoplasia (DENNIS 1999). De acordo com RIGEL (2002), em 1935 o risco cumulativo de melanoma cutâneo calculado para toda a vida era de 1 em 1500 indivíduos enquanto que em 2002 este risco havia crescido para 1 a cada 68 indivíduos.

Numa extensa revisão com dados de países como EUA, Austrália, Itália, Suécia, Grã-Bretanha, LENS e DAWES (2004) encontraram considerável variação de incidência de melanoma sugerindo para alguns países uma tendência a estabilização da incidência enquanto que em outros uma incidência ainda crescente. No entanto analisando a mortalidade nos vários países, os mesmo autores descrevem um aumento na sobrevivência do melanoma ao longo dos anos, atribuído à detecção precoce (LENS e DAWES 2004). Outros estudos confirmam o crescimento na incidência mundial do Melanoma, mas com a mortalidade tendendo à estabilização e aumento nas taxas de sobrevivência em países desenvolvidos,

especialmente devido aos avanços no diagnóstico precoce. (GARBE et al. 2000; MACKIE et al. 2002).

Numa avaliação recente de prevalência de câncer nos EUA (que reflete também os sobreviventes), o melanoma foi o terceiro câncer mais prevalente entre os homens e entre as mulheres, o quinto. A estimativa para melanoma no ano 2016 nos EUA foi de 76380 casos novos a uma idade mediana de 63 anos e com uma expectativa de vida de 92% em cinco anos e de 89% em 10 anos. Em torno de 84% dos melanomas diagnosticados são localizados e nestes casos a sobrevida esperada em cinco anos é de 98% (MILLER et al. 2016).

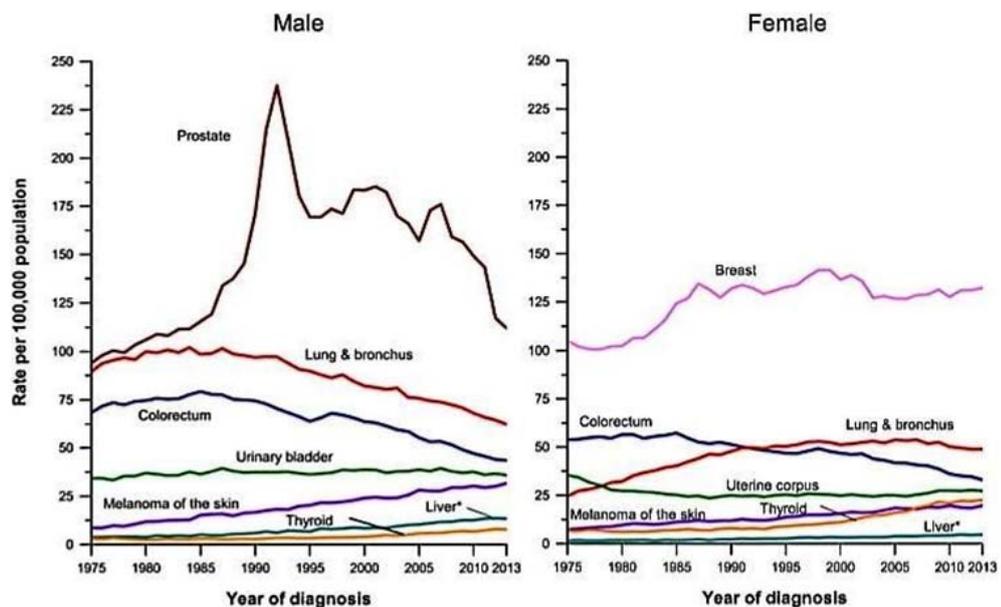
Mais recentemente, dados do SEER *database* publicados em 2017 demonstraram que o melanoma cutâneo é o quinto câncer mais incidente entre os homens e o sexto entre as mulheres, no total com estimados 87100 casos (SIEGEL et al. 2017). Os mesmos autores estimaram quase 10.000 mortes por melanoma nos EUA para o ano de 2017 com os homens representando quase o dobro de mortes comparados às mulheres. A menor mortalidade do melanoma entre as mulheres deve-se ao diagnóstico em estadio mais precoce entre as mulheres além de uma melhor sobrevida das mulheres por estadio clínico (SIEGEL et al. 2017). Apesar destes números SIEGEL et al. (2017) confirmam que o rápido aumento observado na incidência de melanoma da pele observado anteriormente começa a desacelerar, especialmente entre os jovens.

Estimated New Cases						
			Males	Females		
Prostate	161,360	19%			Breast	252,710 30%
Lung & bronchus	116,990	14%			Lung & bronchus	105,510 12%
Colon & rectum	71,420	9%			Colon & rectum	64,010 8%
Urinary bladder	60,490	7%			Uterine corpus	61,380 7%
Melanoma of the skin	52,170	6%			Thyroid	42,470 5%
Kidney & renal pelvis	40,610	5%			Melanoma of the skin	34,940 4%
Non-Hodgkin lymphoma	40,080	5%			Non-Hodgkin lymphoma	32,160 4%
Leukemia	36,290	4%			Leukemia	25,840 3%
Oral cavity & pharynx	35,720	4%			Pancreas	25,700 3%
Liver & intrahepatic bile duct	29,200	3%			Kidney & renal pelvis	23,380 3%
All Sites	836,150	100%			All Sites	852,630 100%

Estimated Deaths						
			Males	Females		
Lung & bronchus	84,590	27%			Lung & bronchus	71,280 25%
Colon & rectum	27,150	9%			Breast	40,610 14%
Prostate	26,730	8%			Colon & rectum	23,110 8%
Pancreas	22,300	7%			Pancreas	20,790 7%
Liver & intrahepatic bile duct	19,610	6%			Ovary	14,080 5%
Leukemia	14,300	4%			Uterine corpus	10,920 4%
Esophagus	12,720	4%			Leukemia	10,200 4%
Urinary bladder	12,240	4%			Liver & intrahepatic bile duct	9,310 3%
Non-Hodgkin lymphoma	11,450	4%			Non-Hodgkin lymphoma	8,690 3%
Brain & other nervous system	9,620	3%			Brain & other nervous system	7,080 3%
All Sites	318,420	100%			All Sites	282,500 100%

Fonte: Adaptado de SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin. 2017 67:7-30

Figura 1 – Taxa de incidência e mortalidade por câncer (dez taxas mais elevadas) por sexo, EUA (2017)



Fonte: Fonte: Adaptado de SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin. 2017 67:7-30

Figura 2 – Taxa de incidência de cânceres selecionados por sexo, EUA (2017)

Dados epidemiológicos da América Latina são menos consistentes. Considerando que o melanoma é a neoplasia de maior aumento em incidência especialmente nos países europeus, espera-se uma relativa elevada incidência de melanoma nos países da América Latina onde houve importante imigração europeia (SCHMERLING et al. 2011).

No Brasil, apesar de corresponder a apenas 5% dos casos de câncer de pele, o melanoma é responsável por 80 a 85% das mortes por câncer de pele (MENDES et al. 2010).

Um significativo aumento na mortalidade por melanoma no Brasil foi observada no período de 1980 a 2005 para ambos os sexos, maior para o sexo masculino. A mortalidade por melanoma no Brasil não é homogênea, sendo mais elevada nas regiões Sul e Sudeste quando comparadas às regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. De acordo com estudo de geoprocessamento espacial, as maiores mortalidades por melanoma na região Sul foram no norte do Rio Grande do Sul e no leste e oeste de Santa Catarina, microrregiões de predomínio de pele clara (FERREIRA e NASCIMENTO 2016). No Brasil, a tendência da curva da mortalidade persiste aumentando para todas as regiões, exceto o Sudeste (MENDES et al. 2010).

Historicamente o melanoma tem sido classificado nos subtipos extensivo superficial, nodular, acral lentiginoso e melanoma tipo lentigo maligno (TSAO et al. 2012; OSSIO et al. 2017) além de variantes menos comuns como desmoplásico e nevíde (TSAO et al. 2012). Nos descendentes de europeus o tipo extensivo superficial tipicamente

predomina, enquanto que na Ásia, África e alguns países da América Latina, bem como em países de descendência não europeia, uma grande parcela dos melanomas cutâneos são dos subtipos nodular e acral lentiginoso, biologicamente diferentes do tipo extensivo superficial (OSSIO et al. 2017). Num trabalho peruano onde mais de 80% dos pacientes eram ditos de raça mestiça, a prevalência do melanoma acral lentiginoso foi de quase 53%, enquanto que o melanoma do tipo extensivo superficial correspondeu a pouco mais de 19% dos casos. Entre os pacientes brancos a localização mais frequente foi tronco e cabeça e pescoço enquanto que entre os mestiços a localização em membro inferior ocorreu em mais de 60% dos casos (DEL CARPIO 2008).

Embora estudos descrevam por volta de 45% de mutações no gene *BRAF* nos melanomas tipo extensivo superficial nos países de população descendente de europeus, pouco se sabe como a doença se desenvolve em países de população não europeia.

Praticamente todos os genes estudados que conferem risco elevado para o desenvolvimento do melanoma (*CDKN2A*, *CDK4*, *BRCA1*) foram estudados em populações europeias ou de ascendência europeia (OSSIO et al. 2017). Não há praticamente estudos genômicos associados a outros subtipos de melanoma, mais frequentes nas populações não europeias, como por exemplo o melanoma acral lentiginoso (OSSIO et al. 2017) e poucos dados clínicos são disponíveis para os países da América Latina (SCHMERLING et al. 2011).

Vários fatores prognósticos anatomopatológicos do melanoma primário são historicamente descritos para o melanoma cutâneo: espessura de Breslow, nível anatômico de Clark, fase da progressão tumoral, subtipo histológico, fenômeno de regressão, ulceração, infiltração de linfócitos intratumoral e peritumoral, índice mitótico, satelitose microscópica, tipo celular, invasão vascular e invasão perineural (BARNHILL e MIBM 1996). Entre estes, notadamente a espessura tumoral e a ulceração são reconhecidos há décadas como fatores que significativamente influenciam o prognóstico do melanoma cutâneo. Para melanomas finos (até 1mm de espessura) a presença de índice mitótico na derme entre 5 a 10/mm² diminuiu a sobrevida em dez anos em aproximadamente 10% quando comparado a índice <1/mm² (THOMPSON et al. 2011), dado este tão relevante que motivou a inclusão deste parâmetro na 7ª edição do TNM, posteriormente retirado na versão mais atual da AJCC. O estudo MSLT-I (Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial I) confirmou como importantes fatores prognósticos a espessura tumoral e ulceração, e numa análise multivariada demonstrou que para melanomas localizados, a presença de metástases no linfonodo sentinela foi o mais forte preditor de recidiva e morte pelo melanoma (MORTON et al. 2014). Mais recentemente, o estudo do MSLT II (Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial II) confirmou que dentro de uma população com reconhecida metástase microscópica no linfonodo sentinela, a espessura tumoral de Breslow bem como a ulceração do tumor primário ainda influenciam o prognóstico (FARIES et al. 2017).

Para uma doença com elevada possibilidade de cura quando do diagnóstico precoce fica bastante claro que a divulgação de informação para prevenção primária e secundária será o maior mediador de mortalidade do melanoma. Uma campanha de educação pública na Grã-Bretanha demonstrou redução no tempo de espera e significativo aumento no diagnóstico de melanomas com espessura de Breslow abaixo de 1,5mm (MACKIE et al. 2003).

1.2 A COR DA PELE, A MELANINA E O MELANÓCITO

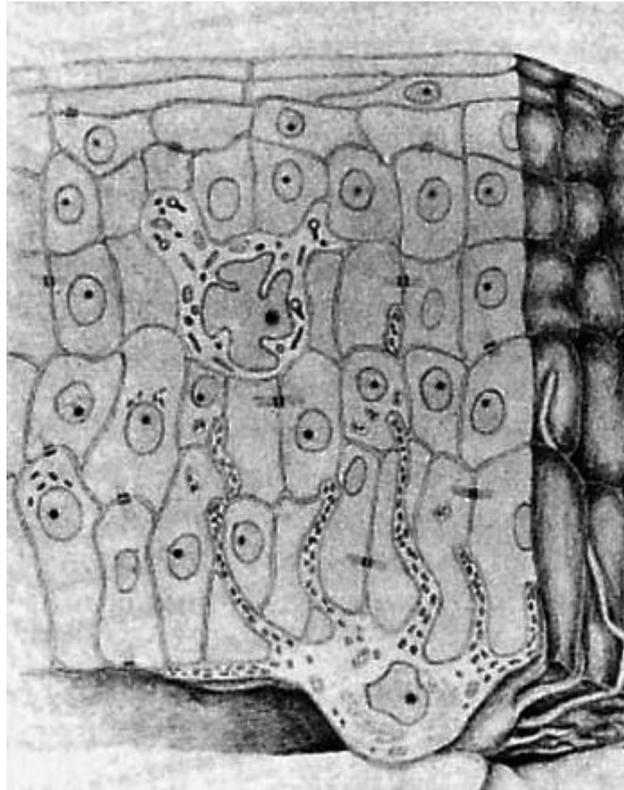
As melaninas não podem ser descritas como uma estrutura bem definida e ainda não existe um consenso a respeito do que a melanina realmente representa. É considerada até hoje o mais enigmático biopolímero da natureza. A primeira referência ao termo melanina é atribuída a Berzelius quando em 1940 referiu-se ao pigmento negro de animais (D'ISCHIA et al. 2013; MAR et al. 2013).

Uma classificação abrangente descreve três categorias de melaninas: melaninas *stricto sensu*, pigmentos fenólicos escuros dos organismos inferiores e pigmentos sintéticos produzidos a partir de precursores naturais. Existem dois tipos principais de melanina: a eumelanina (marrom-preta) e a feomelanina (amarela-vermelha) formadas a partir da ação da Tirosinase (JIMBOW et al. 1976; PROTA 1980). Além destas, existem as neuromelaninas (dentro de neurônios) e as piomelaninas (produzidos por microorganismos) (D'ISCHIA et al. 2013).

A eumelanina e feomelanina são derivadas de um precursor comum, a Dopaquinona, formada pela oxidação do aminoácido L-Tirosina (SIMON et al. 2009). Feomelanina parece ser formada por uma modificação do precursor para eumelanina envolvendo a interação entre Dopaquinona e Cisteína produzida pela oxidação enzimática da Tirosinase (JIMBOW et al. 1976).

A ocorrência ampla da(s) enzima(s) referidas como Tirosinase, necessária à melanogênese, tanto em organismos eucarióticos quanto em procarióticos, é a comprovação que cedo na evolução se desenvolve este processo. Em mamíferos, a pigmentação por melanina ocorre nos cabelos, na pele e nos olhos com uma importante função de proteção contra a luz ultravioleta, controle de calor e coloração adaptativa (PROTA 1980).

A cor da pele é o traço fenotípico mais marcante sendo alvo de pesquisa de várias disciplinas (FAJUYIGBE e YOUNG 2016). A cor natural da pele é produzida por 4 pigmentos: carotenóides (amarelo), melanina (marrom) na epiderme, hemoglobina oxigenada (vermelho) nos capilares e hemoglobina reduzida (azul) nas vênulas da derme. Embora sintetizada no melanócito, a melanina migra para os ceratinócitos. A unidade melânica epidérmica é a relação aproximada entre 1 melanócito e 36 ceratinócitos na sua periferia (JIMBOW et al. 1976; FAJUYIGBE e YOUNG 2016). É a quantidade de melanina nos queratinócitos que significativamente determina a cor da pele e dos cabelos e portanto, é a variação da concentração de melanina nos ceratinócitos que basicamente produz o amplo espectro de cor da pele encontrada nas diversas raças (JIMBOW et al. 1976).



Fonte: Adaptado de JIMBOW et al. (1976)

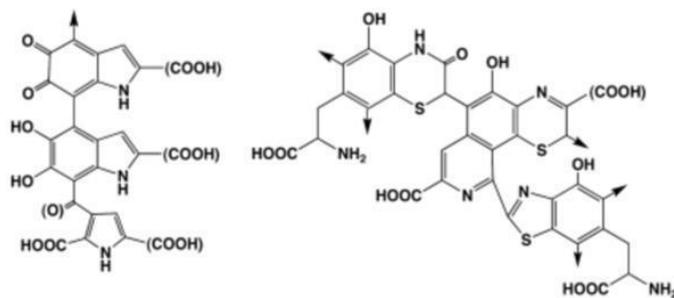
Figura 3 - Unidade melânica-epidérmica. Observar o transporte dos melanosomos (com melanina) e incorporação aos ceratinócitos

A pigmentação da melanina na pele humana é atribuída a dois componentes. A cor constitutiva é dada pela quantidade de melanina gerada por programas celulares genéticos independente da exposição a luz ultravioleta observada em áreas da pele não expostas ao sol. O componente facultativo ou induzido é responsável pelo bronzeamento reversível da pele por exposição a luz ultravioleta (JIMBOW et al. 1976). Dentro de melanócitos e ceratinócitos, a melanina forma uma “capa nuclear” protegendo-o contra a irradiação ultravioleta (FAJUYIGBE e YOUNG 2016).



Figura 4 - Cor constitutiva vs Cor Facultativa

A melanogênese induzida por radiação ultravioleta (UVR), referida tradicionalmente por bronzeamento, ocorre em três tipos. O bronzeamento por pigmentação imediata ocorre logo após a exposição a raios UVA, apresentando-se como coloração de cinza a marrom e durando aproximadamente duas horas. Há também o bronzeamento por pigmentação persistente e o bronzeamento por pigmentação tardia, esta última associada ao aumento de atividade melanocítica e proliferação, mais associado a exposição a raios UVB (FAJUYIGBE e YOUNG 2016).



Eumelanina

Feomelanina

Fonte: Adaptado de SIMON et al. (2009)

Figura 5 - Estrutura da Eumelanina e Feomelanina

Melanogênese, *in vivo*, produz misturas de Eumelanina e Feomelanina. A proporção entre as duas é determinada pela atividade da Tirosinase e disponibilidade da Tirosina e Cisteína nos melanossomos (SIMON et al. 2009). A pigmentação do cabelo, pele e olhos nos animais é basicamente uma manifestação da presença da melanina sintetizada nos melanócitos dentro de organelas definidas como melanossomos (SIMON et al. 2009). A razão entre a eumelanina e a feomelanina correlaciona-se com a cor da pele e a etnia. O processo ao todo inclui: a migração do melanoblastos a partir da crista neural até a epiderme onde se diferenciam em melanócitos, a melanização dos melanossomos a partir da enzima Tirosinase, o transporte destes melanossomos e incorporação aos ceratinócitos e a sua degradação dentro dos ceratinócitos (JIMBOW et al. 1976). Eumelanina foi encontrada em maior concentração no pelo preto de ratos enquanto que a feomelanina foi encontrada em níveis mais elevados no pelo amarelo de ratos (ITO e JIMBOW 1983). Melanossomos são maiores em negróides quando comparados a caucasianos e mongolóides (JIMBOW et al. 1976). Dados mais recentes confirmam que a pele negra contém 4 a 6 vezes mais melanina, depositados em melanossomas grandes através da epiderme até a camada córnea. Contrastando, na pele clara os melanossomos são menores e não alcançam as camadas mais superficiais da pele (FAJUYIGBE e YOUNG 2016).

Estudos epidemiológicos indicam claramente uma associação entre melanina e melanoma. A menor concentração de melanina predispõe o melanócito a maiores efeitos mutagênicos causados pela exposição à

radiação ultravioleta (SIMON et al. 2009). De acordo com FAJUYIGBE e YOUNG (2016), o efeito fotoprotetor da melanina tem sido observado em estudos epidemiológicos comparativos de câncer de pele. No entanto, existem fatores outros não relacionados a quantidade de melanina que interferem na susceptibilidade ao câncer de pele e melanoma, como o tipo de melanina (feomelanina), a capacidade de reparo do DNA e obviamente, o perfil de exposição individual ao sol (FAJUYIGBE e YOUNG 2016).

A classificação da cor da pele foi tradicionalmente definida por Fitzpatrick. Originalmente proposta para avaliação de risco no tratamento de psoríase por fotoquimioterapia, categorizou indivíduos em seis categorias de acordo com as características relatadas de tendência à queimadura solar e capacidade de bronzeamento (FITZPATRICK 1988).

A cor da pele resulta de uma complexa regulação envolvendo 17 genes, especialmente MC1R e TYR (DEL BINO e BERNERD 2013; FAJUYIGBE e YOUNG 2016). O gene MC1R tem direta associação entre cor da pele muito clara e melanoma tendo sido reconhecido como um dos principais genes relacionados a risco moderado de susceptibilidade para o melanoma (TSAO et al. 2012). Estudando camundongos geneticamente modificados no gene MC1R, MITRA et al. (2012) sugerem que indivíduos com polimorfismos de MC1R e fenótipo de cabelos ruivos e pele muito clara, típicos de predominância de feomelanina, têm um risco aumentado para melanoma, tanto por exposição a UVR quanto por uma via intrínseca de carcinogênese da síntese da própria feomelanina.

Embora largamente utilizado, a categorização de tipo de pele de acordo com FITZPATRICK (1988) é sujeita a erros pela subjetividade na avaliação. Eritema é a mais estudada resposta a UVR e têm sido utilizada como indicador pessoal de sensibilidade a UVR. A dose eritematosa mínima (DEM), definida como a menor dose necessária para causar eritema perceptível com bordas definidas nas 24h após a exposição, tem sido questionada como medida para definição de tipo de pele, pois a pele negra parece ser apenas 4 vezes mais protegida do que a pele clara contra o eritema solar (FAJUYIGBE e YOUNG 2016). Muitos estudos avaliaram a relação entre a DEM e o tipo de pele de acordo com FITZPATRICK (1988) com considerável variação e superposição entre os grupos.

A importância da avaliação da cor da pele deriva do fato de que provavelmente o risco de melanoma cutâneo induzido pela UVR parece depender muito mais das características individuais da pele, como o tipo e a concentração de melanina, do que com a etnia. Preocupados com a crescente incidência e elevada mortalidade entre hispânicos norte americanos DASGUPTA e KATDARE (2015) estudaram em laboratório cultura de melanócitos de três etnias (brancos, hispânicos e negros). Analisando padrões de resposta à exposição a luz ultravioleta, concluíram que o risco de melanoma é muito mais dependente da pigmentação melânica e da bagagem genética do que da etnia em si, enfatizando que o risco de desenvolvimento de melanoma entre hispânicos acompanha a grande variedade na pigmentação da pele que existe nessa população.

O modelo desenvolvido para avaliação da cor da pele por FITZPATRICK (1988) utiliza um formato subjetivo de avaliação das características da reação da pele à exposição solar, classificando os fototipos em seis categorias divididas em números romanos visando aferir a sensibilidade da pele humana ao sol. Varia do fototipo I, usualmente em indivíduos brancos de olhos claros e cabelos vermelhos ao fototipo VI, onde a densidade da melanina protegeria o indivíduo ao ponto que sempre haveria bronzeamento e nunca queimaduras solares (PERSHING et al. 2008). Avaliando a classificação de FITZPATRICK (1988), PERSHING et al. (2008) admite que o uso desta classificação gera uma tendência natural dos avaliadores a correlacionar com a etnia.

No trabalho original de FITZPATRICK (1988), a tabela proposta de fototipos de pele era baseada não na cor do cabelo e dos olhos, mas na resposta dos pacientes indagando-os sobre a exposição de 45 a 60 minutos ao meio dia no início do verão ao norte na latitude entre 20-45°. As perguntas básicas eram: qual a intensidade de sua queimadura solar (eritema, edema e desconforto) após 24h da exposição e quanto de bronzeamento foi desenvolvido em 1 semana. Na prática, de acordo com FITZPATRICK (1988) haveria dois grupos de populações brancas com respostas completamente opostas às duas perguntas. No fototipo I haveria referência a dolorosa queimadura solar em 24h e nenhum bronzeamento em sete dias. No extremo a resposta seria nenhuma queimadura dolorosa, mas bom bronzeamento aos sete dias e representaria o fototipo IV. Entre os dois fototipos haveria o semelhante ao tipo I, mas com algum bronzeamento ao

final de sete dias (fototipo II) e o semelhante ao grupo IV, mas referido alguma queimadura nas primeiras 24h (fototipo III). Embora fototipo I correspondam na sua maioria a ruivos ou loiros e de olhos azuis, pode haver indivíduos com cabelos escuros e olhos castanhos. Mais tarde foram incluídos o grupo V e VI representando os indivíduos de cor morena e os negros respectivamente (FITZPATRICK 1988).

Quadro 1 - Fototipos de pele segundo Fitzpatrick

Cor de pele (pele não exposta)	Tipo de pele	Queimadura solar	Bronzeado
Branco	I	Sim	Não
	II	Sim	Mínimo
	III	Sim	Sim
	IV	Não	Sim
Marrom	V	Não	Sim
Preto	VI	Não	Sim

Fonte: Adaptado de FITZPATRICK (1988).

Muitos investigadores insatisfeitos com a subjetividade da estratificação de fototipos proposta por FITZPATRICK avaliaram outros métodos como quantificação da eumelanina cutânea e feomelanina na pele intacta ou epiderme reconstruída, além de técnicas outras não invasivas como vídeo fluorescência, colorimetria reflectiva, e espectrofotometria de reflectância difusa (PERSHING et al. 2008). A variabilidade sazonal da cor da pele facultativa (áreas fotoexpostas como dorso do antebraço, frente) chega a ser duas vezes maior do que da cor da pele constitutiva (nádegas, face volar superior do braço) (PERSHING et al. 2008).

A busca por um método mais objetivo de avaliação de fototipo com a avaliação apenas da cor da pele constitucional levou PERSHING et al. (2008) a desenvolver um método com uso do espectrofotômetro de reflectância e aferição na área volar do braço a 5 cm da axila independente da observação de eritema induzido por UVR ou resposta melanogênica, cor de cabelo, cor dos olhos ou etnia. Ficou claro neste trabalho que havia discordância entre o método empregado e a tabela de Fitzpatrick, atribuída pelos autores a vieses na avaliação clínica de fototipo pelo método mais tradicional de Fitzpatrick.

Uma outra classificação objetiva da cor da pele de seis categorias (de muito clara a escura) proposta utiliza os parâmetros colorimétricos como L^* (Luminância) e b^* (componente amarelo/azul) com a determinação matemática do que o autor chamou de ângulo tipológico individual (ATI) (CHARDON et al. 1991). Utilizando-se desta metodologia DEL BINO e BERNERD (2013) avaliaram 852 mulheres caucasianas (procedentes da França, EUA e Rússia), 227 africanas (França e EUA), 209 hispânicas e brasileiras (Brasil, México e EUA) e 1546 asiáticas (China e Japão) e observaram que entre as hispânicas e asiáticas as cores de pele eram mais heterogêneas. Entre as hispânicas variou de pele clara a morena (DEL BINO e BERNERD 2013).

DEL BINO e BERNERD (2013) estudando amostras de pele da mama submetendo-as à exposição a diversas doses de UVR comprovaram lesão de DNA em todas as camadas da epiderme para as peles claras, intermediárias e bronzeadas, mas apenas nas camadas suprabasais nas

peles morenas e negras. O achado se repetiu estudando especificamente o dano ao melanócito, demonstrando que a dose eritematosa equivalente não causa comparável dano ao DNA do melanócito nas diferentes cores de pele. O estudo comprova que mesmo peles mais pigmentadas como intermediária e pardas, notadamente hispânicos, afro-americanos e asiáticos podem apresentar dano em todas as camadas da epiderme e portanto também merecem atenção a fotoproteção (DEL BINO e BERNERD 2013).

1.3 RADIAÇÃO ULTRA-VIOLETA

A radiação ultravioleta é considerada como importante fator no desenvolvimento do melanoma da pele por afetar diretamente o DNA dos melanócitos (MONZON et al. 1998). Em um trabalho de revisão sobre fatores carcinogênicos modificáveis para humanos, WHITEMAN e WILSON (2016) apontaram entre vários, a exposição à radiação ultravioleta. Somente em 1992 a IARC (*International Agency for Research on Cancer*) declarou pela primeira vez a radiação ultravioleta (UVR) como agente cancerígeno para humanos ao mesmo tempo que reconheceu a exposição solar como a maior fonte desta exposição (WHITEMAN e WILSON 2016).

A energia emitida pelo sol é transmitida na forma de ondas eletromagnéticas. A UVR é a radiação eletromagnética na banda de espectro entre 100 e 400nm (UVC de 100 a 280, UVB de 280 a 315, UVA de 315 a 400nm) correspondente a menos de 10% da radiação solar incidente na camada mais externa da atmosfera (CORRÊA 2015). Apesar de

corresponder uma pequena fração da radiação solar é a UVR a maior responsável por efeitos fotobiológicos e fotoquímicos (CORRÊA 2015).

A medida da UVR desenvolvida por pesquisadores canadenses e adotada desde 1994 pela OMS é o índice UV (UVi), uma escala numérica relacionada a indução de eritema na pele humana pela UVR entre 280-400nm (basicamente UVA e UVB), usada para alertar perigo para a pele e a saúde de qualquer indivíduo, muito embora se conheça que o tempo para desenvolvimento de eritema seja maior para fototipos elevados de pele (CORRÊA 2015).

Muitos fatores alteram os níveis de UVR na superfície terrestre: componentes da atmosfera (aerossóis, nuvens, gases), parâmetros geográficos (latitude, longitude, altitude, habilidade de refletir a UVR na superfície) e parâmetros temporais (data, estação do ano, hora).

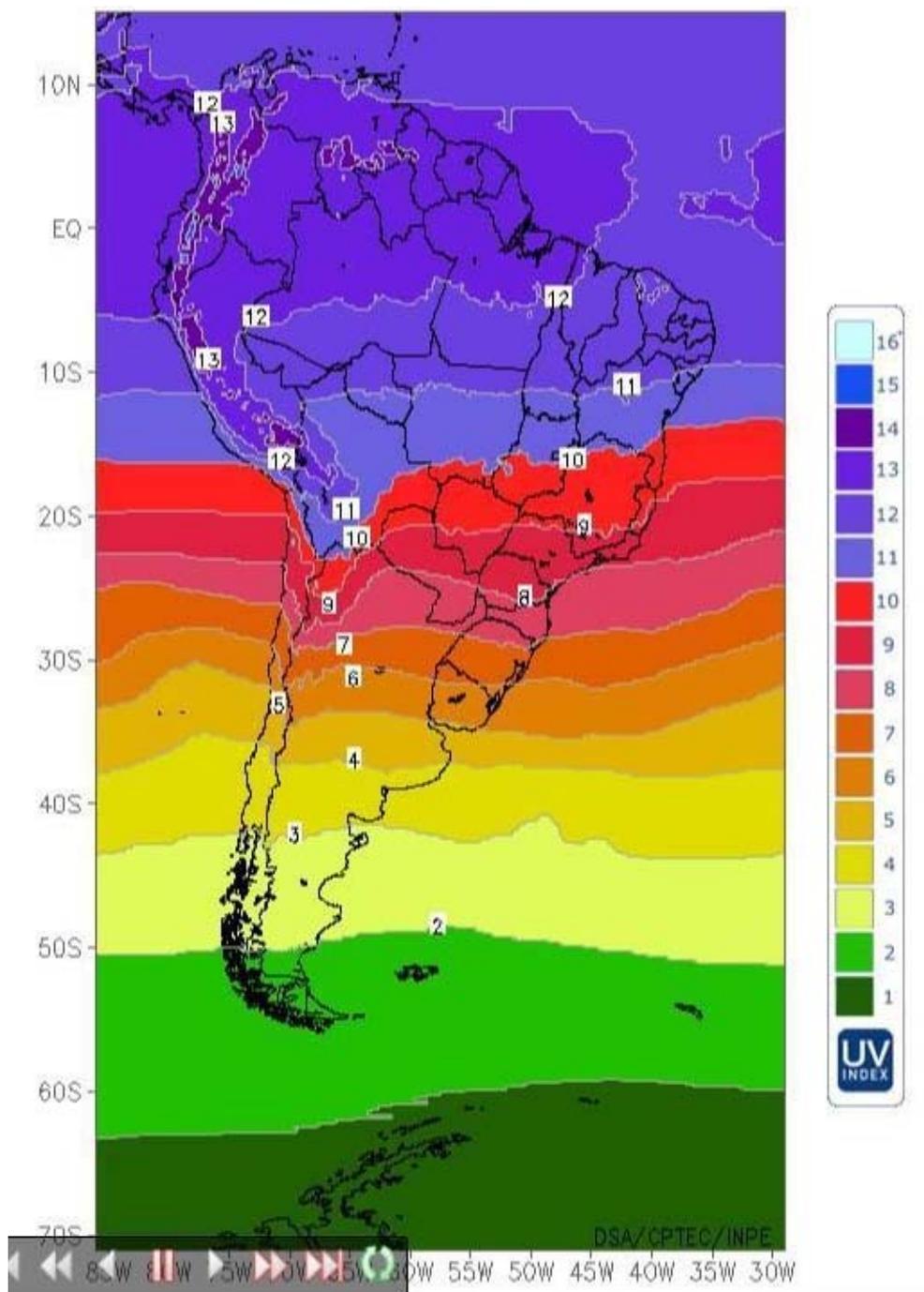
Em relação aos gases atmosféricos o ozônio é o principal absorvedor da radiação ultravioleta. O fenômeno de diminuição deste gás na Atmosfera causado por liberação de clorina ou bromida derivados do clorofluorocarbono (usado especialmente em fluidos para resfriamento) bem conhecido como “buraco de ozônio” não exerce significativo efeito na quantidade de ozônio sobre o Brasil (CORRÊA 2015). Tal fenômeno de destruição da camada de ozônio acontece tipicamente durante a primavera nas regiões polares, sobretudo no hemisfério sul, onde tal “buraco” pode atingir até 10 milhões de quilômetros quadrados nas regiões de elevada latitude (CORRÊA 2015).

A maior irradiação solar acontece em baixas latitudes próximas a linha do Equador, sendo que nas latitudes elevadas há maior sazonalidade na intensidade de UVR com as maiores variações entre o inverno e o verão. A altitude por sua vez influencia sobremaneira sendo considerado que a partir de 1000m de altitude, cada 1km a mais é acompanhado por um incremento de 5-10% na intensidade de UVR.

De acordo com CORRÊA (2015) é um erro atribuir ao buraco de ozônio os elevados índices de radiação ultravioleta que acontecem no Brasil. Na verdade tais índices são típicos e naturais em grande parte do país por se situar em baixa latitude, próximo a linha do Equador onde mais radiação solar atinge a superfície terrestre. Considerando a inclinação da terra de aproximadamente 23° em relação ao sol, as latitudes ao redor deste ângulo receberão durante o verão elevada irradiação solar como é o caso do Sudeste brasileiro, onde já se registrou UVi acima de 15. No caso do Norte e Nordeste brasileiro, devido a sua proximidade com a linha do Equador, até mesmo durante o inverno do hemisfério sul, a radiação ultravioleta ainda atinge elevados índices entre 8-11.

Como regra no Brasil, de acordo com os parâmetros da OMS, os UVi atingem da escala muito elevada (8-10) até extremamente elevada (acima de 11). No Nordeste estes índices já são encontrados antes das nove horas da manhã. Desta forma no nordeste brasileiro há constantemente elevados UVi variando de aproximadamente 8-11 durante o solstício de inverno a 12-13 durante o solstício de verão (CORRÊA 2015).

O Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) fornece por acesso a internet (<http://satelite.cptec.inpe.br>) mapas atualizados de UVi do Brasil e de vários países da América do Sul, inclusive com demonstração, para cada capital de estados brasileiros, da curva de UVi ao longo do dia.



Fonte: INPE (2017)

Figura 6 – Índice ultravioleta na América do Sul

O efeito mutagênico da UVR envolve uma cadeia de eventos induzida por dano ao DNA. A UVB causa modificações na molécula desencadeando reações de dimerização entre pirimidinas adjacentes formando principalmente dímeros ciclobutano pirimidina (CPDs) e fotoprodutos pirimidina 6-4 pirimidona (6-4PPS). Com a exposição a UVA há a modificação de isômeros dos 6-4PPS (SCHUCH et al. 2012). Há ainda danos indiretos ao DNA por exposição a UVR, notadamente por formação de radicais livres de oxigênio (SCHUCH et al. 2012). A variação do efeito biológico da irradiação solar pode variar de acordo com a latitude sendo demonstrado importantes diferenças na indução de 6-4PPs na região próximo a linha do Equador, considerado como um marcador biológico de exposição local a UVB (SCHUCH et al. 2012).

Embora não exista evidência suficiente do uso de protetores solares para evitar o melanoma cutâneo, num estudo com camundongos geneticamente modificados para melanócitos com mutação *BRAF V600E*, os protetores solares, embora não protegessem completamente, atrasaram o aparecimento do melanoma (VIROS et al. 2014).

1.4 ELASTOSE SOLAR

A elastose solar pode ser definida histologicamente como o acúmulo de fibras elastóticas anormais na derme relacionado à exposição a UVR. Um dos mecanismos descritos é a ativação do promotor de elastina humana induzida pela UVR (UITTO 2008). Embora mais frequentemente encontrada

em sítios anatômicos com grande exposição solar, nenhum determinante fenotípico tem sido associado ao fotodano (THOMAS et al. 2010). Do ponto de vista histológico, a elastose solar se caracteriza por redução do colágeno da derme que se torna basofílico além de fragmentação de fibras elásticas e acúmulo de material amorfo interfibrilar (HORENSTEIN et al. 2007).

O risco de Melanoma é diretamente relacionado com a exposição solar intermitente e pode ser inversamente relacionado a elevada e contínua exposição solar. Elastose solar tem sido considerado como um biomarcador de exposição solar cumulativa sendo frequentemente encontrado na pele adjacente ao melanoma (GANDINI et al. 2005; THOMAS et al. 2010; BAUER et al. 2011). De acordo com THOMAS et al. (2010) a falta de relação entre queimaduras solares e elastose solar pode explicar a elastose solar como consequência da exposição solar cumulativa e não exposição solar intermitente. Em áreas geográficas de maior exposição solar a elastose solar tende a desenvolver mais precocemente durante a vida (BAUER et al. 2011). A análise da elastose solar pode indicar o mecanismo e via de malignização por dano solar crônico e pode auxiliar até no diagnóstico diferencial entre lesões melanocíticas benignas e malignas (HORENSTEIN et al. 2007).

Num extenso trabalho revisando 2589 lâminas de melanomas cutâneos primários, THOMAS et al. (2010) estabeleceram o grau de elastose solar na pele adjacente à lesão em severa, moderada, leve e ausente de acordo com critérios adotados por LANDI et al. (2006). Ficou evidente a forte associação entre a idade e elastose solar. A elastose era significativamente mais comum nos sítios cabeça e pescoço e braços quando comparada a

áreas menos expostas ao sol como pernas e tronco. Na cabeça e pescoço, 94% das lesões apresentavam elastose solar adjacente e em 59% foram consideradas severas. Da mesma forma, a presença de elastose solar era relacionada a fototipos mais baixos (inabilidade de bronzeamento e tendência a queimadura solar) exceto quando ajustado por sítio anatômico. Foi observado neste mesmo estudo uma relação inversa entre elastose solar e número elevado de nevos, o que suporta a teoria de que portadores de grande número de nevos podem desenvolver melanoma com uma menor exposição solar.

Crescentes evidências sugerem que o melanoma é um grupo heterogêneo de subtipos biológicos distintos. Numa coorte de indivíduos portadores de melanoma procedentes dos EUA, Europa e Austrália observou-se uma associação inversa entre frequência de mutação do gene *BRAF* e a elastose solar que se manteve como variável independente numa análise multivariada estratificada por idade. A associação independente de severa elastose solar e melanoma sem mutação do gene *BRAF* indica uma outra via de cancerização, onde há o papel de uma cumulativa exposição ultravioleta para alguns tipos de melanomas (BAUER et al. 2011).

Elastose solar severa está positivamente associada a idade, sítio cabeça e pescoço, subtipo melanoma nodular, espessura tumoral, tempo de exposição solar total ou ocupacional bem como com a presença de ceratoses actínicas e história de efélides na adolescência. No entanto há uma associação inversa com a presença de nevos residuais contíguos ao melanoma, número de nevos na adolescência, capacidade para

bronzamento profundo e contagem total de nevus (KVASKOFF et al. 2015). Num estudo de pacientes portadores de melanomas de tronco e da região da cabeça e pescoço (excluídos os melanomas tipo lentigo maligno melanoma, já historicamente relacionados a exposição solar crônica) foi observado que os portadores de melanoma cutâneo de tronco associado a severa elastose solar na pele adjacente a lesão são mais velhos, têm maior exposição solar acumulada, apresentam mais ceratoses actínicas e efélides quando comparados aos com pouca ou nenhuma elastose solar no mesmo sítio anatômico (KVASKOFF et al. 2015).

Do ponto de vista molecular, melanomas BRAF/NRAS selvagens tendem a ser um grupo mais complexo de melanomas e estão associados à elastose solar severa. Não por coincidência melanomas associados a elastose solar têm uma elevada carga de mutações e muitas delas transições C>T e transições dinucleotídeos CC>TT, típicas daquelas induzidas por UVR (MAR et al. 2013).

1.5 BIOLOGIA MOLECULAR NO MELANOMA

Muito mais que massas de células malignas em proliferação, tumores malignos são tecidos complexos de múltiplas distintas células com interações entre elas. Células normais recrutadas formam o estroma tumoral e participam ativamente da tumorigênese (HANAHAN e WEINBERG 2011).

A marca do fenótipo maligno tem sido reconhecida há anos e compreendem seis capacidades biológicas adquiridas. São elas: a

sinalização para a proliferação sustentada, a evasão de fatores supressores de crescimento, a resistência à morte celular, a imortalidade replicativa, a indução de angiogênese e a ativação de invasão e metástase. Além destas seis, outras duas marcas foram reconhecidas mais recentemente: a reprogramação da energia celular e a fuga à destruição imune (HANAHAN e WEINBERG 2011).

Desde a descoberta do primeiro receptor de primeira Tirosina-quinase há mais de 25 anos, muitos receptores de membrana desta mesma família têm sido relacionados a processos celulares como diferenciação e proliferação, sobrevivência e metabolismo celular, controle do ciclo celular e migração celular (LEMMON e SCHLESSINGER 2010). Todos os receptores de Tirosina-quinase (TK) têm estrutura semelhante com um receptor de ligante de domínio extracelular, uma hélice transmembrana simples e uma região intracitoplasmática que contém uma proteína Tirosina-quinase (LEMMON e SCHLESSINGER 2010).

Os fatores de crescimento (FC) atuam no controle da maioria dos processos celulares fundamentais incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência e metabolismo celular, bem como na migração e no controle do ciclo celular (LEMMON e SCHLESSINGER 2010). De modo geral, fatores ligantes causam alterações conformacionais no domínio extracelular e induzem a oligomerização de receptores de superfície celular que por sua vez ativam o domínio intracelular Tirosina-quinase seguindo sinalizações intracelulares (ULLRICH e SCHLESSINGER 1990). Uma vez ativadas, as TKs recrutam e ativam uma série cadeias de sinalizações moleculares. Com

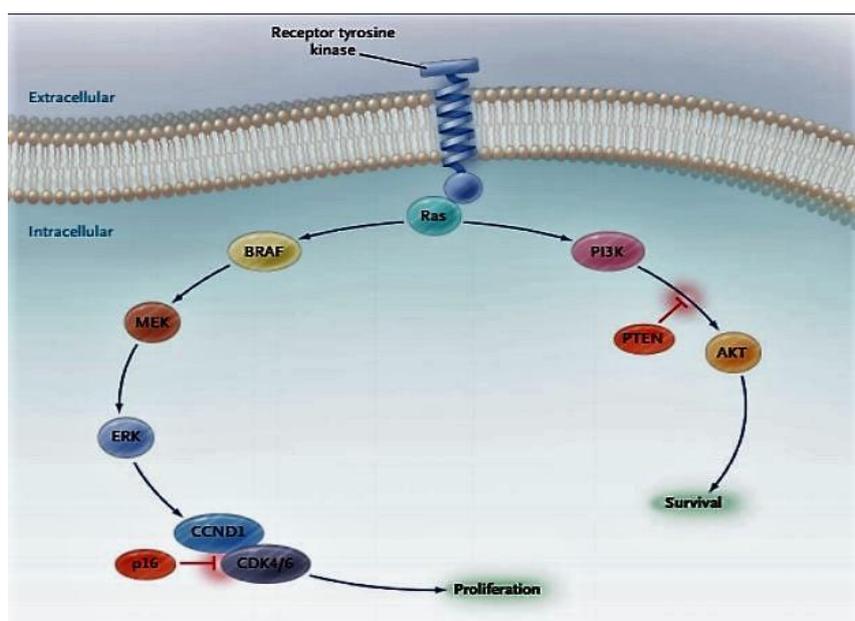
a ação de múltiplas fosfotirosinas e envolvimento de outras proteínas ditas de ancoragem, as TKs ativadas vão recrutar e influenciar um grande número de moléculas sinalizadoras formando uma rede de transmissão de informações não somente para o interior, mas também para o exterior das células (LEMMON e SCHLESSINGER 2010).

Mutações que alterem a atividade de receptores de TK estão associados a vários cânceres humanos, como por exemplo mutações somáticas no gene *KIT* (DIBB et al. 2004). Ativações aberrantes (por mutação) de receptores de Tirosina-quinase (RTK) são mediados por quatro principais mecanismos: ativação autócrina, translocações cromossômicas, superexpressão de RTK e mutações com ganho de funções (LEMMON e SCHLESSINGER, 2010).

Fatores prognósticos biomoleculares, além dos já conhecidos fatores anatomopatológicos, têm sido relatados e terapias sistêmicas mais recentes dependem cada vez mais do conhecimento de mutações específicas indutoras da melanogênese.

Grandes diferenças em regiões genômicas aberrantes foram descritas entre melanomas cutâneos associados a fotodano, melanomas cutâneos em áreas de pele sem fotodano, melanomas de mucosa e melanomas acrais (CURTIN et al. 2005). Melanomas acrais têm significativamente maior grau de aberrações cromossômicas. Amplificações foram observadas em 89% dos melanomas acrais e foram pouco frequentes em melanomas cutâneos de pele com e sem fotodano demonstrado por elastose solar (CURTIN et al. 2005).

Aterações genéticas de melanoma de mucosa, acral e de áreas cronicamente expostas ao sol apresentam vias de malignização envolvendo os genes *CDK4* e *CCND1*, usualmente sem mutações nos genes *BRAF* e *NRAS* (HORENSTEIN et al. 2007). Também foi demonstrado elevada expressão de p53 em melanomas de áreas com fotodano como em melanomas de cabeça e pescoço (WHITEMAN et al. 1998). Melanomas de pele sem fotodano têm frequentemente mutações no gene *BRAF*, enquanto melanomas em pele com fotodano crônico mais comumente não apresentam mutação de *BRAF* (CURTIN et al. 2005; HORENSTEIN et al. 2007).



Fonte: Adaptado de CURTIN et al. (2005)

Figura 7 - Cascatas de sinalização a partir do receptor de Tirosina quinase

As duas mais estudadas vias de sinalização do circuito proliferativo de grande importância na malignização do melanócito são a Ras/Raf/MEK/ERK, chamada via MAP-Kinase (*Mitogen-activated Protein kinase*) e a

Ras/PI3K/PTEN/Akt/Mtor, chamada via PI3K (*Phosphatidylinositol 3' kinase*) (CURTIN et al. 2005). *BRAF*, *NRAS*, *KIT* e *PTEN* são importantes genes envolvidos na patogênese do melanoma (WILSON e NATHANSON 2012). Mutações constitutivas de *NRAS* e *BRAF* são frequentes em melanomas cutâneos e portanto a via MAPK é constitutivamente ativada na maioria dos casos de melanomas esporádicos (DAVIES et al. 2002).

Embora ambas desempenhem papéis críticos na proliferação celular, a via MAPKinase também está envolvida na apoptose celular exercendo efeito importante na fosforilação das moléculas reguladoras de apoptose Bad, Bim, Mcl-1 e caspase 9 (MCCUBREY et al. 2007). As duas vias Ras/Raf/MEK/ERK e Ras/PI3K/PTEN/Akt/Mtor interagem entre si (STEELMAN et al. 2004; MCCUBREY et al. 2007; CHAPPELL et al. 2011) e são eventos complexos, geralmente iniciados na superfície celular, levando ao controle da expressão gênica dentro do núcleo celular a partir da mediação de uma série de quinases, fosfatases e várias proteínas de troca (CHAPPELL et al. 2011). A via PI3K exerce regulação sobre a via RAF/MEK/ERK/Akt e pode mediar a inativação de RAF, B-Raf (MCCUBREY et al. 2007). Além disso, esta via também inclui fosfatases que servem para regulação negativa dos efeitos promotores de crescimento pela atividade de PI3K. Mutações nestas fosfatases podem eliminar suas atividades levando a progressão tumoral (MCCUBREY et al. 2007).

Componentes das vias de sinalização podem estar mutados em diversos cânceres humanos (PINES et al. 2010; CHAPPELL et al. 2011). Ativação anormal destas vias ocorrem por mutações nos RTK a montante ou

nos componentes intra-celulares a jusante por mutação de genes *RAS*, *BRAF*, *PI3K*, *PTEN* e *AKT* (MCCUBREY et al. 2007). Na via MAPkinase os genes mais envolvidos no desenvolvimento do melanoma são o *BRAF* e o *NRAS*. Na via PI3K o gene *PTEN* é o regulador negativo mais comumente envolvido, ocorrendo mutações sincrônicas com mutações de *BRAF*, mas não com *NRAS*, que por sua vez é capaz de ativar as duas vias (CURTIN et al. 2005).

Além dos fatores ligantes receptores específicos é possível iniciar a cascata RAF/MEK/ERK por meio de espécies reativas de oxigênio (KIM et al. 2001). Considerando a formação de radicais livres de oxigênio por tratamentos clássicos para câncer, este tipo de ativação poderia ter papel na resistência tumoral (MCCUBREY et al. 2007).

De acordo com HODIS et al. (2012) a carga de mutações no melanoma é maior do que em qualquer tumor reportado (incluindo tumor de pulmão) e as mutações com assinatura UV predominam em mais de 80% dos melanomas.

Num dos primeiros estudos de detecção de mutação, DAVIES et al. (2002) encontraram mutação de *BRAF* em 43 linhagens de câncer, entre elas, 20/34 (59%) melanomas, 7/40 (18%) cânceres colorretais, 4/38 (11%) de gliomas, 4/7 (14%) de cânceres de pulmão (todos quatro adenocarcinomas), 1/45 (2%) de cânceres de mama e 1/7 (14%) de cânceres de fígado. Mutações de *BRAF* não foram encontradas em linhagens celulares derivados de câncer de bexiga, próstata, rim, testículo, colo e corpo uterino, estômago, pâncreas e neuroblastomas. Todas as 43

mutações somáticas encontradas nas Linhagens celulares ocorreram nos éxons 11 e 15.

A principal via de sinalização de controle de proliferação e diferenciação em melanoma opera por ativação de *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*). *BRAF* é um proto-oncogene (MASSAD et al. 2014) e RAF é uma proteína quinase serina/treonina ativada pela proteína RAS-GTP (DAVIES et al. 2002). A família RAF corresponde a A-RAF, B-RAF e C-RAF (RAF-1). *BRAF* é a mais potente ativadora de MEK e a mais frequentemente mutada (MCCUBREY et al. 2007). Conforme DAVIES et al. (2002) a maior frequência de mutação somática de *BRAF* entre tumores malignos humanos é encontrada em melanoma e parece não estar relacionada aos efeitos da luz solar. Em melanoma cutâneo aproximadamente 90% das mutações de *BRAF* afetam a valina na posição 600, sendo em 89% das vezes V600E (MCCUBREY et al. 2007; DAVIES e SAMUELS 2010). Esta mutação T1799A no éxon 15 do gene *BRAF* gera a substituição da Valina pelo ácido Glutâmico na posição 600 da proteína (LEE et al. 2011), antes considerada V599E, atualmente reconhecida como V600E (DOMINGO e SCHWARTZ 2004). A proteína mutada tem comprovada elevada atividade tipo quinase, substancialmente maior do que a proteína selvagem (DAVIES et al. 2002). Evidências sugerem que a mutação de gene *BRAF* é um evento que por si não é suficiente para desenvolver o melanoma, visto que melanomas *BRAF* V600E que apresentam nevos residuais, estes também apresentam a mesma mutação. Também nenhum início de mutação V600E foi identificada na transição da fase de crescimento

in situ para fase vertical e nenhuma perda de associação entre a mutação e o nível de Clark foi observada indicando que além de precoce, a mutação é mantida durante a evolução da doença (VENESIO et al. 2008). Exposições intermitentes, intensas e repetidas têm sido associadas a maior frequência de mutação V600E no gene *BRAF* tanto em nevos adquiridos quanto em melanomas (VENESIO et al. 2008).

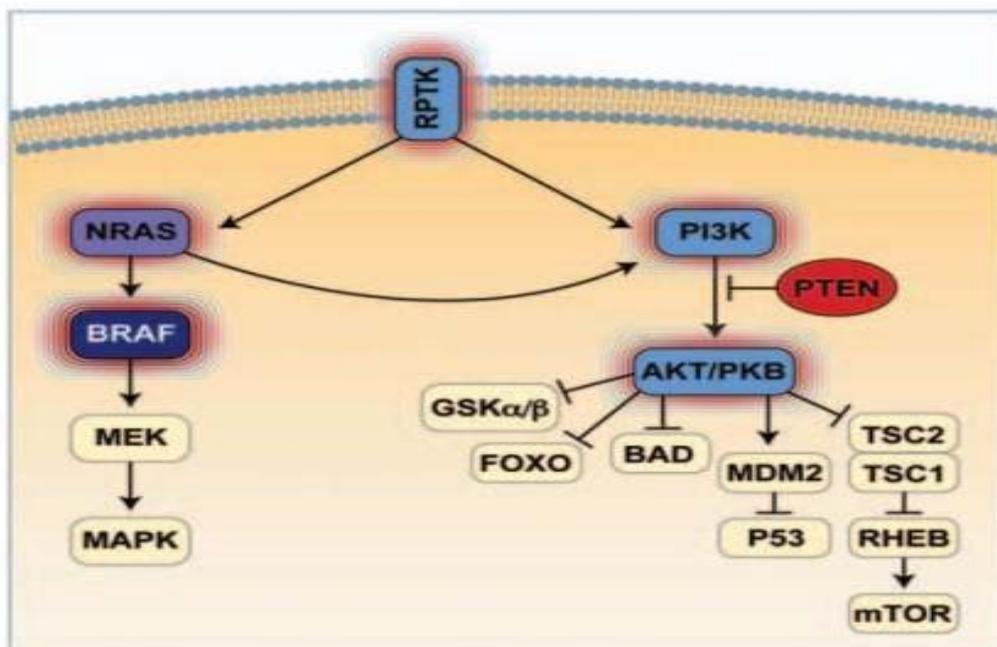
Mutantes de genes da família *RAS* (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*) ativam, a semelhança de *BRAF* mutado, a via RAS-RAF-MEK-MAPK, mas também ativam uma série de outras vias incluindo a PI3K-AKT (MCCUBREY et al. 2007). As mutações mais frequentes do gene *RAS* encontradas nos cânceres humanos ocorrem nos códons 12,13,59 e 61 (STEELMAN et al. 2004). Em melanomas a isoforma *NRAS* (*neuroblastoma rat sarcoma oncogene*) está mutada em 15 a 20% dos casos, 90% deles no códon 61 (DAVIES et al. 2002; DAVIES e SAMUELS 2010), sendo as mais frequentes Q61R e Q61K (LEE et al. 2011).

Mutações de *BRAF* e *NRAS* são mutuamente exclusivas, isto é, na presença da mutação *BRAF*, o *NRAS* é selvagem e vice-versa (DAVIES et al. 2002; TSAO et al. 2004; CURTIN et al. 2005; HODIS et al. 2012; WILSON e NATHANSON 2012).

O KIT, um RTK tipo III e seu ligante, o fator de célula tronco, estão envolvidos em hematopoiese, espermatogênese e melanogênese (ASHMAN 1999; ASHMAN e GRIFFITH 2013). Após a fixação do ligante há uma dimerização do receptor, autofosforilação e ativação de várias vias de sinalização para proliferação, invasão, inibição de apoptose e metástase

(CARVAJAL et al. 2011). Os éxons mais frequentemente envolvidos em mutações do gene *KIT* são 11 e 13 segundo CARVAJAL et al. (2011) e 11 e 17 segundo BEADLING et al. (2008). As mutações pontuais de *KIT* mais encontradas foram as substituições no éxon 11 W557R, K558N, V559A, V559D, L576P e no éxon 17 Y823D (BEADLING et al. 2008). Em melanomas acrais, ficou caracterizado mutações no gene *KIT* (CURTIN et al. 2006; DAVIES e SAMUELS 2010) podendo ocorrer nestes subsítios em 20% (CARVAJAL et al. 2011) a 23% dos casos (BEADLING et al. 2008). Da mesma forma que na pele glabra, há também maior frequência de mutação *KIT* entre melanomas cutâneos na pele que apresenta fotodano mais severo (BAUER et al. 2011).

Mutação somática do gene supressor *PTEN* (*tumor-supressor gene phosphatase and tensin homolog*) está presente em 10-30% dos melanomas (DAVIES e SAMUELS 2010). *PTEN* regula negativamente a atividade de Akt (STEELMAN et al. 2004). A perda da função por mutação da fosfatase *PTEN*, amplifica a via de sinalização do PI3K-AKT, importante via envolvida na angiogênese e no desenvolvimento tumoral (JIANG e LIU 2009). Akt3 e BRAF V600E agem conjuntamente para promover transformação maligna do melanócito (CHEUNG et al. 2008). Como RAS estimula diretamente a via PI3K e *PTEN* atenua a sinalização de PI3K, tanto alterações de RAS bem como de *PTEN* podem contribuir para potencialização da atividade de Akt, achado comum em Melanomas (TSAO et al. 2004).



Fonte: Adaptado de DAVIES e SAMUELS (2010).

Figura 8 – As duas vias: Ras/Raf/MEK/ERK e Ras/PI3K/PTEN/Akt/Mtor

Um estudo de camundongos geneticamente modificados para melanócitos com mutação *BRAF* V600E expostos a radiação UV demonstrou que a mutação de *TP53* era relacionada à radiação UV (pelas características transições Citosina para Timina no final 3' dos dímeros de pirimidina) além da sua importância como gatilho para acelerar o desenvolvimento de melanoma nos melanócitos com a mutação (VIROS et al. 2014). Outro estudo demonstrou que o gene *TP53* foi o que apresentou o maior número de mutações do tipo induzidas por UVR entre todos os genes mutados sequenciados em 135 pacientes portadores de melanoma, segundo o autor modificando o dogma inicial que melanomas humanos se caracterizavam por apresentar *TP53* selvagem (HODIS et al. 2012). Mutações induzidas por UVR no gene *TP53* acontecem em aproximadamente 20% dos melanomas (HODIS et al. 2012).

Melanócitos contendo a mutação *BRAF* V600E necessitariam de uma mudança genética adicional para que reentrem no ciclo celular (TSAO et al. 2004; CHEUNG et al. 2008). Tal fato teria explicação pela divergente resposta de senescência celular pela via MAPK/ERK por ativação a partir da mutação V600E do *BRAF* que leva a ativação de inibidores de quinase ciclina dependentes como p21^{Cip}, p16^{Inka} e p27^{kip1} funcionando como um mecanismo de defesa das células normais para não responderem a ativação pelo oncogene (CHEUNG et al. 2008). Conforme sua extensa revisão e usando dados próprios, CHEUNG et al. (2008) descrevem que aproximadamente 50% dos Melanomas que apresentam mutação no *BRAF* apresentam também amplificação de AKT3 e/ou perda de PTEN, resultando na desregulação da via AKT.

A mutação de *BRAF* é frequente em nevos e melanomas, mas a perda da expressão de PTEN ocorre em 63% dos Melanomas e em apenas 8% dos nevos, sugerindo que a inativação de PTEN pode ser fator causal de progressão de nevo para melanoma (TSAO et al. 2004).

Num estudo utilizando linhagens de melanoma e alguns espécimes de metástases de melanoma, mutação de *BRAF* e *PTEN* ocorreram simultaneamente, enquanto que a mutação de *NRAS* era exclusiva e em menor frequência, sugerindo que há interação entre a ativação da via MAPKinase pela mutação de *BRAF* associada a perda de *PTEN*. A ativação da via PI3K coopera na oncogênese, enquanto que a mutação de *NRAS* ativa por si as duas vias e seria o evento necessário para o desenvolvimento do melanoma (TSAO et al. 2004). Em espécimes de melanomas primários

os achados se repetiram com uma maior frequência de mutação de *BRAF* e perda *PTEN* ou mutação de *NRAS* em sítios onde não havia dano solar crônico (CURTIN et al. 2005). Posteriormente, HODIS et al. (2012) confirmaram que mutação ou deleção focal de *PTEN* está presente em 44% dos casos de melanoma com a mutação de *BRAF* e apenas em 4% dos melanomas com mutação *NRAS*.

Numa metanálise de 36 estudos de mutação de *BRAF* e 31 estudos de mutação de *NRAS*, a primeira foi referida em 41% (1028/2521) e a segunda em 18% (355/1972) dos casos. Mutações *BRAF* foram mais frequentes para os seguintes fatores clínico-patológicos: melanoma do tipo extensivo superficial (49%), localização tronco (57%), área sem dano solar crônico (49% vs 33%), mulheres (46% vs 41%), menores que 50 anos (47% vs 40%) Breslow menor ou igual a 1mm (49% $B \leq 1\text{mm}$; 39% $4\text{mm} \leq B < 1\text{mm}$; 32% $B > 4\text{mm}$). Mutações *NRAS* foram mais frequentes para os seguintes fatores clínico-patológicos: melanoma do tipo nodular (27%), localização extremidades (25%), área de dano solar crônico (24% vs 17%), mulheres, maiores que 50 anos (20% X 11%), Breslow menor ou igual a 1mm (20% $B \leq 1\text{mm}$; 18% $4\text{mm} \leq B < 1\text{mm}$; 20% $B > 4\text{mm}$). No entanto há heterogeneidade estatística dos estudos reconhecida pelo autor em vários pontos analisados (LEE et al. 2011).

Em uma coorte de 88 casos de melanomas primários provenientes do Líbano e Paquistão a taxa de mutação de *BRAF* foi de 27,3%, na sua maioria a mutação V600E (87,5%) seguida da mutação V600K em 12,5%. Para os melanomas primários estudados, a prevalência da mutação de

BRAF foi maior nas regiões de menor exposição a UVR, com 32,1% no Líbano contra 20% no Paquistão, e a elastose solar era mais severa entre os melanomas primários com *BRAF* selvagem (16,7% vs 26,6%). O tronco e membros inferiores foram os sítios anatômicos com mais mutações de *BRAF* (37,5% para ambos os sítios) (MASSAD et al. 2014). Analisando dados de outros países observa-se que a frequência de mutação *BRAF* no Líbano e Paquistão é intermediária quando comparada a com coortes da China (15%), Alemanha (29%), Austrália (45%), Califórnia-EUA (47%), Suécia (54%) e Texas-EUA (65%) (MASSAD et al. 2014).

Um estudo do MD Anderson Cancer Center, analisando espécimes de melanomas avançados, entre metástases e melanomas cutâneos primários, observou 41% de mutações *BRAF* V600 e 22% de *NRAS*. Considerando apenas melanomas acrais (apenas 8% da amostra) verificou-se 24% de mutações *NRAS*, *KIT* em 16% e apenas 7% de mutações *BRAF* V600. Entre as mutações V600 de *BRAF*, a mutação V600E prevaleceu com 76% enquanto que a V600K ocorreu em 17% dos espécimes. Em toda a coorte (incluindo melanomas de mucosa, uveal, acral, cutâneo) mutações de *TP53* aconteceram concomitante com mutações de *NRAS* em 17%, com *BRAF* V600E em 12% e com V600K em 7%. Entre metástases e melanomas primários havia concordância nas mutações em todas as mutações de *BRAF* e em 97% das mutações de *NRAS* (SIROY et al. 2015).

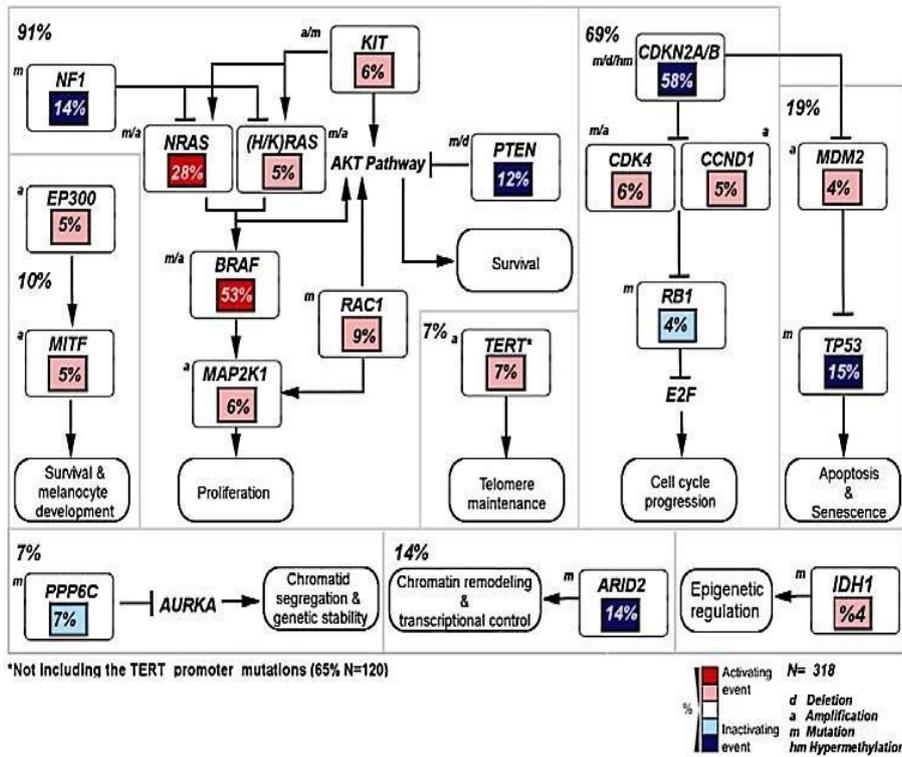
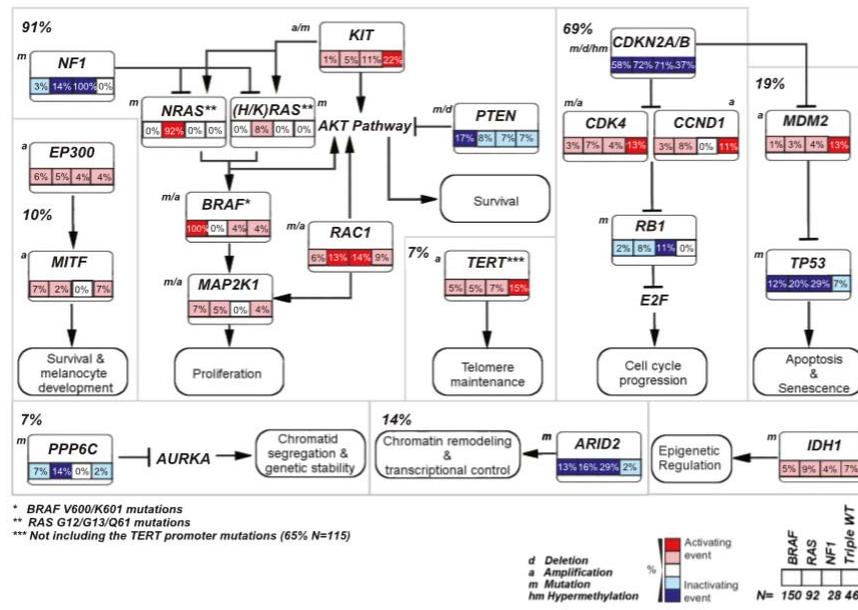
Em 171 casos de melanomas primários e metastáticos de uma coorte japonesa de estadios IB a IV, a localização mais frequente foi palmo-plantar, com média de idade de 60 anos para localização em tronco e pescoço e de

65 anos para localização região palmar, plantar, aparato ungueal, face e mucosa. A positividade para mutação de *BRAF* (94,2% mutação *BRAF* V600E e 5,8% mutação *BRAF* V600K) foi de 30,4%, sendo o escalpo, o mais frequente sítio, seguido do tronco e extremidade. O local de menor frequência desta mutação foi face, aparelho ungueal, palma e planta. Mutação de *NRAS* foi detectada em 12,9% dos casos sendo mais prevalente na face e região palmoplantar. Mutação de *KIT* foi mais prevalente no aparelho ungueal, mucosa e região palmoplantar. Elastose solar (excetuando-se localização palmoplantar e mucosa) escore de 2-3⁺ (moderada a severa) de acordo com a classificação original de LANDI et al. (2006) foi identificada em apenas 15,2% dos pacientes. Nestes houve baixa taxa de mutação *BRAF* e *NRAS* sugerindo que existe relação inversa entre dano solar crônico e mutação de *BRAF* tanto em caucasianos quanto em japoneses (SAKAIZAWA et al. 2015).

Num estudo brasileiro com uso de 132 amostras de melanomas cutâneos primários de adultos jovens (18-30 anos) provenientes de um Laboratório de consultoria do interior de São Paulo e outro do interior do Rio Grande do Sul, os sítio anatômicos mais frequentes foram tronco (32%) e membros inferiores (25%). Dos 93 casos que tiveram extração e amplificação do DNA, a mutação *BRAF* V600E foi detectada em 35,1% dos casos, mais prevalente nos casos de membros e tronco. Nesta série não houve relação entre a mutação *BRAF* V600E e nível de Clark, espessura de Breslow, tipo histológico, invasão perineural e linfática, satelitose ou elastose solar. A presença do fenômeno de regressão, moderado a intenso infiltrado

inflamatório foi inversamente associado a presença de mutação de *BRAF*. Apenas ulceração foi marginalmente significativo para prevalência de mutação *BRAF* V600E ($p=.05$). Interessante observar que nos poucos casos de elastose moderada a intensa (3 casos), nenhuma mutação de *BRAF* foi detectada (ESTROZI et al. 2014).

O *Cancer Genome Atlas Network* (2015) analisou amostras frescas de 67 melanomas primários e 266 melanomas metastáticos (80%) por seis tipos de análise molecular global, incluindo sequenciamento total. Vários oncogenes e genes supressores foram reconhecidos como genes significativamente mutados, entre eles os já bem estabelecidos *BRAF*, *NRAS*, *CDKN2A*, *TP53*, *PTEN*, além de outros mais recentemente reconhecidos *RAC1*, *MAP2K1*, *PPP6C* e *ARID2*, além de outros como *NF1*, *IDH1* e *RB1* (Cancer Genome Atlas Network 2015). Foram detectados 52% de mutação de *BRAF* (87% V600E), 28% de mutação de *NRAS* (Q61R, Q61K, Q61L, Q61H entre outras), 14,7% de mutação de *TP53* (94% com assinatura UV), aproximadamente 12% de mutação de *PTEN*. Os números se assemelham aos apresentados por HODIS et al. (2012) que descreveu mutação de *BRAF* em 63%, *NRAS* em 26%, *TP53* em 19% e *PTEN* 12% (associado a deleções este último alcança 37%). Baseado nas mutações encontradas é sugerida uma classificação genômica de melanoma em 4 subtipos: subtipo *BRAF*, subtipo *RAS*, subtipo *NF1* e Subtipo triplo selvagem onde a mutação *KIT* é incluída, além de outras mutações relacionadas a melanoma uveal (Cancer Genome Atlas Network 2015).



Fonte: Cancer Genome Atlas Network (2015)

Figura 9 - Vias alteradas no melanoma

Melanomas sem as mutações clássicas de *BRAF* e *NRAS* apresentam uma elevada e significativa maior carga de mutações relacionadas a severo dano pela UVR. Melanomas *BRAF/NRAS* selvagem apresentam uma associação com elastose solar e mutações com elevada proporção de transição C>T e transições CC>TT, características de assinatura de exposição a UVR. Interessante que parece não haver acúmulo de mutações a medida que eleva-se a espessura do melanoma cutâneo (MAR et al. 2013). As várias vias de cancerização para melanomas *BRAF/NRAS* selvagens representam um desafio no futuro considerando as terapias alvo, ao ponto de MAR et al. (2013) proporem uma classificação de melanomas em *BRAF* mutados, *NRAS* mutados e melanoma com elevada carga de mutações (*BRAF/NRAS* selvagens) para futuras implicações terapêuticas.

1.6 A POPULAÇÃO BRASILEIRA E NORDESTINA

Entre hispânicos, inclusive com avaliação de brasileiros, já se reconhece a grande variedade e heterogeneidade da cor da pele (DEL BINO e BERNERD 2013). Embora deva-se considerar muitas variáveis no diagnóstico e tratamento para o melanoma, como acesso a sistema de saúde e nível educacional, o mesmo trabalho clama para atenção aos hispânicos e afro-americanos que apresentam 31% de risco de metástases por melanoma, bem acima dos 4% em caucasianos de acordo com o Centro de Controle de Doenças de Atlanta em 2012 (DEL BINO e BERNERD 2013).

A população brasileira é composta por muitas raças. Muitos brasileiros descendem de duas ou mais raças e existe um grande espectro de cor da pele entre os brasileiros. Quase toda a população é exposta a intensa UVR e o acesso ao sistema de saúde é precário, notadamente para os provenientes das zonas rurais (VAZQUEZ et al. 2015).

O Brasil apresenta grandes diferenças demográficas internas e diferentes climas e intensidades de radiação ultravioleta. Esta variação entre as regiões é comprovada com o censo do IBGE onde na região sul 83% das pessoas se declaram brancas enquanto que no norte mais de 70% se declaram não brancos (MENDES et al. 2010).

A população branca, usualmente descendentes de europeus, predomina no Sul e Sudeste enquanto que a população não branca alcança 60% nas regiões Norte e Nordeste. Da mesma forma há que se considerar que os descendentes de ibéricos, sobretudo portugueses estão distribuídos em toda a nação brasileira, mas é no Sul e Sudeste que se concentram os descendentes de italianos, países da europa central e leste europeu. (MENDES et al. 2010).

Muitos são os fatores envolvidos na grande miscigenação que ocorreu e ocorre no Brasil. Os portugueses que vieram ao Brasil no período colonial não trouxeram mulheres (ou por serem degredados ou por virem em caráter provisório) e esta decisão foi o marco inicial do processo de miscigenação (SOAREZ 2006). Os portugueses eram tão dados a miscigenação que Freyre (2004), citado por SOAREZ (2006, p.37) cita que a fama dos portugueses como contribuintes na disseminação de doenças sexualmente transmissíveis era tamanha que entre japoneses, chineses e

indianos, a sífilis era designada como “*mambakassen*” cujo significado é “doença dos portugueses”.

Conhecido como o braço branco na formação do povo brasileiro, o povo português em si já descendia de uma miscigenação de milênios antes, considerando que a Península Ibérica já havia sido invadida e ocupada por fenícios, romanos e mouros (SOAREZ 2006). Para SOAREZ (2006) mais do que qualquer outro povo, o português tem como característica uma especial tolerância com a miscigenação interracial. Ao contrário da tolerância, permeabilidade e adaptabilidade, características da colonização portuguesa, a dominação na região de Pernambuco pelos holandeses por cerca de 40 anos por exemplo, resultou em integração cultural e racial quase nula.

De acordo com SOAREZ (2006), mais de 8 milhões de negros foram trazidos ao Brasil formando assim além do branco e índio, o outro braço racial do povo brasileiro. É prova que a miscigenação racial no Brasil foi tão grande que até a língua portuguesa usada no Brasil adicionou palavras faladas por índios, ciganos, espanhóis e africanos (SOAREZ 2006). A outra grande prova da especial confraternização racial e cultural ocorrida no Brasil é o sincretismo religioso que mistura traços africanos com a igreja católica.

Simplificando a origem do povo brasileiro SOÁREZ (2006, p.109) descreve:

“...a formação do povo brasileiro é resultado da relação entre três elementos étnicos cujas culturas são bastante distintas e oriundas de meios geográficos diferenciados, que se miscigenaram numa combinação terciária, dando origem a três outras binárias, que se misturaram novamente, desde então gerando uma mestiçagem embaralhada e indefinida”. E ainda citando Darcy Ribeiro (SOAREZ, 2006 p.79) resume ainda mais o povo brasileiro como um “povo novo, como uma entidade étnica e configuração cultural, destribalizando índios, desafricanizando negros e deseuropeizando brancos”.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar o perfil clinicopatológico, imunoistoquímico e molecular do melanoma cutâneo primário de pacientes atendidos e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os aspectos sócio-demográficos e clinicopatológicos de melanomas cutâneos incluindo fototipo da pele, localização anatômica e parâmetros prognósticos de microestadiamento;
- Classificar a elastose solar da pele na adjacência do melanoma cutâneo primário;
- Pesquisar a expressão das proteínas PTEN, p53, BRAF V600E nos melanomas primários da pele;
- Pesquisar a prevalência das mutações *BRAF* V600E, *KIT* V559A e *NRAS* Q61L, importantes para o prognóstico e preditivos de resposta a novas terapias alvo-específicas nos melanomas primários da pele.
- Correlacionar achados clinicodemográficos, anatomopatológicos, biomoleculares e imunoistoquímicos dos melanomas primários analisados.
- Avaliar sobrevida global e livre de recorrência de acordo com os parâmetros analisados.

3 MATERIAL E METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDO E AMOSTRA

Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo e prospectivo, clínico-patológico e molecular de melanoma cutâneo primário de pacientes tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), os quais preencheram os critérios de elegibilidade.

Os dados clínicos e demográficos do presente trabalho foram coletados a partir da ficha idealizada durante a consulta de rotina de pacientes portadores de melanoma (consultas de primeira vez ou de retorno/proservação). Nesta visita era estabelecido o fototipo da pele do paciente de acordo com a tabela proposta por FITZPATRICK (1988). Ao mesmo tempo foi observado o resultado do exame anatomopatológico, anotados dados como prontuário, endereço e telefone, localização do primário, subtipo do melanoma, número do exame anatomopatológico para localização posterior dos blocos e lâminas. Da mesma forma era aplicado o TCLE (vide anexo) e a carta de esclarecimento (vide anexo) sendo que cópias foram entregues aos pacientes, outras anexadas aos prontuários e outras guardadas com o investigador em forma de livros encadernados. Aos pacientes para os quais haviam já sido aplicados o TCLE como proposta do projeto anterior foram enviados as cartas de esclarecimentos de uso de material biológico (vide anexo) para os endereços constantes nas fichas já

preenchidas de acordo com o adendo projeto (atual projeto) apresentado e aprovado na Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer do Ceará (processo 025/2013 aprovado na reunião de 30/07/13).

Desta forma os dados começaram a ser catalogados em fichas de 09 de novembro de 2011 até 08 de abril de 2016 tendo sido aplicados ao todo em 143 pacientes portadores de 156 melanomas cutâneos primários. Cada melanoma cutâneo primário foi considerado como um caso.

Dados demográficos, clínicos e anatomopatológicos além de dados referentes ao tratamento foram coletados em fichas (em anexo) a partir de revisão de prontuários (apenas um prontuário não localizado). Realizado atualização de estado da doença (sobrevida) a partir de nova revisão dos prontuários em setembro a novembro de 2017, dados do registro hospitalar de câncer e ainda contato telefônico com alguns pacientes.

Dados de microestadiamento original foram levantados a partir dos laudos presentes nos prontuários ou no sistema *PathoControl* do Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba. Por rotina do serviço, todos os pacientes submetidos a biópsia excisional prévia tinham revisão de exame anatomopatológico, sendo estas revisões realizadas no hospital consideradas para fins de microestadiamento.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa do Instituto do Câncer do Ceará, sob o Processo N° 025/2013, aprovado em 30/07/2013. (Anexo 1)

Número do Parecer - Plataforma Brasil: 535.979

Data da Relatoria: 20/02/2014

CAAE - 18323813.7.0000.5528

3.3 CRITÉRIOS PARA ELEGIBILIDADE

Todos os pacientes que eram portadores de melanoma cutâneo (tratados ou aguardando tratamento) e assinaram o TCLE foram incluídos no estudo para avaliação. Cada melanoma foi considerado um caso dentro da casuística. Todos os pacientes incluídos tiveram avaliação do fototipo da pele (exceto um) bem como de dados clínicos e demográficos a partir de revisão de prontuários (um prontuário não localizado).

Foram considerados critérios de inclusão para o estudo biomolecular e imunoistoquímico: presença de material arquivado (Laboratório de Patologia do HHJ/ICC) e identificado dos pacientes previamente avaliados para fototipo da pele e dados clínico-demográficos (blocos de parafina) com possibilidade de extração de DNA e coleta de amostra para confecção de TMA (*punch* de 2mm) sem que houvesse prejuízo do material restante ou esgotamento dos blocos que compunham o exame do paciente.

Para análise de elastose solar, a presença de representatividade de pele normal adjacente ao tumor primário nas lâminas originais é que determinou a inclusão para a avaliação desta variável.

Os critérios de exclusão para análise biomolecular e imunoistoquímica foram: não localização dos blocos de parafina, ausência de representatividade do tumor no bloco de parafina.

3.4 CLASSIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO DA ELASTOSE SOLAR

Foi realizada revisão das lâminas originais de HE disponíveis para a avaliação de elastose solar por microscopia óptica por uma única patologista (Dra. Maria do Perpétuo Socorro Saldanha da Cunha) e classificadas as amostras de acordo com LANDI et al. (2006) nos escores 0, 0+, 1-, 1, 1+, 2-, 2, 2+, 3-, 3 e 3+ em ordem progressiva de severidade da elastose, conforme o Quadro 2.

Quadro 2 - Escores de Elastose solar

Escores	Achados histopatológicos
Escore 0+	Esparças e isoladas fibras elastóticas, praticamente só visualizadas no maior aumento
Escores 1-, 1 e 1 +	Fibras elastóticas melhor definidas sem formação de bandas
Escores 2-, 2 e 2+	Bandas elastóticas paralelas a epiderme podem ser visualizadas
Escores 3-, 3 e 3+	Extensas áreas amorfas difusas ou não com ou sem perda de núcleos

Inicialmente procedeu-se a seleção de áreas de pele adjacentes ao tumor horizontal e verticalmente no menor aumento onde havia elastose mais significativa e posteriormente com o auxílio do maior aumento a área escolhida era classificada sendo considerada a zona de elastose mais pronunciada para escolha do escore. Foram tabulados os dados como originalmente observados e posteriormente optado por agrupamento de escores em 4 grupos: 0,0+ (ausente ou mínima), 1-,1 (leve), 1+,2-,2(moderada) e 2+,3-,3,3+(intensa).

3.5 EXTRAÇÃO DE DNA E RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES

A extração de DNA foi obtida a partir de cortes dos tecidos fixados (melanomas cutâneos primários) em formalina e conservados em parafina (FFPE–*Formalin-fixed paraffin-embedded*) dos pacientes portadores de melanoma. Inicialmente 62 amostras foram submetidas a extração utilizando-se o *kit* RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Life Technologies, USA). Posteriormente 44 amostras foram extraídas utilizando-se o *kit* DNA Sample preparation kit (Roche Diagnostica, USA).

Todos os blocos de parafina localizados representativos do tumor primário foram pareados com suas lâminas histopatológicas correspondentes coradas em HE para demarcação da área tumoral pelo mesmo patologista (Dra. Maria do Perpétuo Socorro Saldanha da Cunha). A área tumoral selecionada deveria apresentar uma quantidade de células neoplásicas superior a 70% das células totais.

A extração de DNA ocorreu no ambiente do Laboratório de Biologia Molecular do ICC a partir da preparação manual de amostras para obtenção de DNA genômico (gDNA). Para a macrodissecção, foram realizados cerca de 8 cortes de 5µm de espessura. As lâminas contendo os cortes foram lavadas em xilol por 5 minutos e etanol a 100% por 5 minutos a fim de promover a remoção da parafina. Posteriormente, foram realizadas as raspagens da área tumoral demarcada e coletadas em tubos de polipropileno de 1,5 ml contendo 180 uL de tampão TLB e 70 uL de proteinase K, com incubações sucessivas a 56°C por 1 h e 90°C por 1 h, nos termoblocos eppendorf em agitação constante a 300 rotações por minuto (rpm). Em seguida, foram adicionados 200 µL de tampão PBB (DNA *binding buffer*) e a solução foi homogeneizada por agitação vigorosa tendo sido incubada a 28°C por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado 100 uL de isopropanol.

- ✓ Extração de DNA - *kit DNA Sample preparation kit* (Roche Diagnostica, USA)

Resumidamente, o conteúdo era transferido, para o Cobas 4800 test filter tube com um tubo coletor acoplado, centrifugado a 8.000 rpm, com posterior descarte do tubo coletor. A coluna era acoplada a um novo tubo coletor e adicionado a 500 µL de WBI seguido de centrifugação a 8.000 rpm. Adicionalmente, acrescentou-se 500 uL de WBII à coluna e centrifugado a 8.000 rpm, bem como centrifugação a 20.000 rpm para secagem completa da coluna e que era transferida para novo tubo coletor com adição de 100 µL

de tampão de eluição (DNA EB) e posterior incubação por 10 min a 28°C. O DNA extraído era coletado após centrifugação a 8.000 rpm.

- ✓ Extração de DNA: Kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation (Life Technologies, USA)

Após a extração o gDNA foi quantificado o DNA no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. A leitura da absorbância 260 nm forneceu a quantidade total de rendimento de ácido nucleico. A razão das leituras 260/280 nm (A260/A280) foi utilizada para verificar a qualidade do DNA obtido de cada amostra. Foram realizadas leituras em duplicata ou triplicata para determinação da quantidade de DNAg. O gDNA obtido de cada amostra foi mantido a -20°C até a realização dos testes moleculares.

- ✓ Detecção da mutação de *BRAF*, *KIT* e *NRAS* pela tecnologia *competitive allele-specific* TaqMan® PCR (CAST-PCR).

Para os primeiros 62 casos, amostras extraídas de DNA foram encaminhadas para o Laboratório LAFICA da Universidade Federal do Ceará onde foram processadas em plataforma aberta Step One Plus (ThermoFisher USA) para rastreamento de éxons mutados por PCR Alelo-Específico em tempo real, conforme instruções do *kit* TaqMan Mutation Test (Life Technologies) para as mutações dos genes *BRAF*, *NRAS* e *KIT*. O ensaio foi desenvolvido para a genotipagem do códon 600 (éxon 15) do gene *BRAF* V600E (*Human v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog*

B1) localizado no cromossomo 7 para avaliação da transversão de uma timina (T) por uma adenina (A); para mutação *NRAS* Q61L (*Human neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) localizado no cromossomo 1, genotipagem no códon 61 e para a mutação *KIT* V559A (*tyrosine-protein kinase Kit* ou CD117), conforme tabela 02. Foram realizados alguns testes de biologia molecular para cálculo do dCt cutoff para validação do ensaio de mutação. Para calcular e detectar possíveis amplificações inespecíficas foi utilizado amostras de DNA extraídas de melanoma nas quais foram realizadas o rastreamento de mutação pela Método de BRAF V600E Cobas da Roche cujo resultado havia revelado amostras *Wild Type*-WT (selvagem ou ausência de mutação). Foram feitos em triplicatas e adicionalmente em três amostras WT.

Quarenta e quatro amostras foram mantidas no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Haroldo Juaçaba do ICC para rastreamento da mutação V600E no éxon 15 (códon 600) do gene *BRAF*, pela tecnologia de TaqMan por PCR em tempo real, de acordo com as instruções do kit Cobas®4800 BRAF V600 Mutation Test (Roche Diagnóstica).

Quadro 3 - Especificações dos ensaios de genotipagem TaqMan (CastPCR) utilizados no presente trabalho.

Gene	BRAF V600E		NRAS Q61L	KIT V559A
ID ensaio	Hs00001384_mu	Hs00000111_mu	Hs00001047_mu	Hs00000844_mu
Tipo de ensaio	Alelo mutado	Alelo mutado	Alelo mutado	Alelo mutado
Mutação nucleotídeo	1799_1800TG>AA	1799T>A	182_183AA>TG	1676T>C
Troca de aminoácido	V600E	V600E	Q61L	V559A
Nome do ensaio	BRAF_475_mu	BRAF_476_mu	NRAS_30646_mu	KIT_1255_mu

3.6 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA PTEN, p53, BRAFV600E

Realizou-se imunistoquímica em 7 blocos de TMA (*Tissue Microarray*) previamente confeccionados a partir da coleta de *punchs* de 2mm obtidos de 102 blocos de FFPE representativos de tumor primário após pareamento com lâminas de HE correspondentes com delimitação do tumor primário e sugestão de local para obtenção cilindro de material. Fragmentos de pele normal, placenta e músculo foram incluídos em cada TMA como controles internos positivos e negativos além de fragmento de melanoma cutâneo com reconhecida mutação do gene *BRAF*. Todos os casos, exceto um (falta de material) foram inseridos nos blocos de TMA em duplicatas. Foram utilizados os anticorpos PTEN (clone 6H2.1 DAKO™), p53 (clone DO-

7 DAKO™ Code-Nr. M 7001) e as reações foram realizadas de forma automatizada no Auto Stainer (DAKO™). A etapa de reativação antigênica foi processada no sistema PT-Link (DAKO™) em pH padronizado para cada anticorpo conforme especificação em bula tendo sido utilizado o sistema de amplificação FLEX Plus (DAKO™). Os tempos de incubação seguiram indicações do fabricante. Para a pesquisa de V600E, utilizou-se o anti BRAF V600E (VE1 Ventana) e a reação automatizada no sistema fechado BenchMark Ultra.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico utilizando-se os seguintes critérios de escores previamente estabelecidos. Para PTEN e BRAF V600E foi avaliada a expressão citoplasmática. A expressão IHQ de PTEN foi classificada quanto à intensidade em negativo, positivo fraco e positivo forte (igual ao controle interno pele) conforme o trabalho de SAKR et al. (2010). Para BRAF V600E foi utilizado escores negativo, positivo fraco, positivo moderado e positivo forte de acordo com o proposto por O'BRIEN et al. (2017).

Para p53 foi analisado a porcentagem de área tumoral com expressão nuclear da proteína e categorizado posteriormente de acordo com o trabalho de WHITEMAN et al. (1998). Após os dados tabulados de acordo com o observado, variáveis categóricas foram criadas para expressão de PTEN e BRAF V600E tendo sido considerado apenas como negativas amostras sem expressão e positivas as amostras com expressão em qualquer intensidade. Para p53 a porcentagem foi categorizada em variáveis dicotômicas (até 1% e acima de 1%, até 10% e acima de 10%, até 30% e acima de 30%) para

análise de associação com as demais variáveis clínico-demográficas, patológicas e biomoleculares.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SPSS® 22.0, realizando-se o Teste do Qui-quadrado (χ^2) e Teste Exato de Fisher para as avaliações de associação entre variáveis qualitativas. As variáveis quantitativas idade, índice de Breslow, porcentagem de áreas tumoral (expressão de p53) foram categorizadas. Para o índice de Breslow a estratificação foi para todas as análises assim determinada: até 1mm; acima de 1 até 2mm; acima de 2 até 3mm; acima de 3 até 4mm e acima de 4mm. Para idade e porcentagem de expressão de p53, mais de uma categorização foi realizada.

A sobrevida global foi calculada a partir da data do início do tratamento até a última consulta ou data do óbito. A sobrevida livre de recorrência foi considerada da data do início do tratamento até a data da recidiva.

Para análises de sobrevida foram realizados o teste de Log Rank Mantel nas curvas de sobrevida de Kaplan Meier. Para análise multivariada na avaliação de sobrevida foi utilizado o método de regressão de Cox.

Foram considerados estatisticamente significantes, valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E CLÍNICA

Ao todo, 156 casos de melanomas cutâneos primários foram avaliados em 143 pacientes com admissão entre 12 de maio de 2003 e 27 de julho de 2016. Dez pacientes apresentaram mais de um melanoma cutâneo. Oito pacientes apresentaram dois melanomas, um paciente apresentou três melanomas e um paciente era portador já na admissão de 4 melanomas cutâneos primários.

Cento e dois melanomas (65,4%) acometeram pacientes do sexo feminino. A idade variou entre 17 e 96 anos com média de 55,7 e mediana de 56 anos. Quase 65% dos casos ocorreram em maiores de 50 anos. Foram provenientes da zona urbana 82,5% dos casos. Metade dos pacientes registraram endereço em Fortaleza-CE, mas ao todo 49 municípios do estado do Ceará tiveram casos incluídos neste estudo. Dos cento e trinta três casos onde a informação estava presente, 12% dos melanomas aconteceram em pacientes analfabetos e em 65,4% dos casos os pacientes tinham nível de instrução até o nível primário completo.

Os fototipos I a III predominaram com 72,9%, sendo que o fototipo II foi o mais prevalente representando isoladamente 40% dos casos. Nenhum paciente fototipo VI foi incluído durante o estudo.

O sítio anatômico tronco foi o mais acometido, representando 35,3% dos casos, embora membros superiores e inferiores tenham representado 32,6% dos melanomas estudados, excetuando-se as localizações palmar e plantar. Face e pescoço representaram pouco mais de 14% dos casos e melanomas em localização subungueal, palmar e plantar somaram 17,8% dos casos. Um terço dos melanomas cutâneos localizavam-se em área considerada desnuda, considerando roupas de uso diário.

Em mais da metade dos melanomas (52,9%), os pacientes foram admitidos já submetidos a biópsia excisional prévia e todos, exceto um, tiveram estudo anatomopatológico revisado antes do tratamento. Satelitose clínica e metástase em trânsito já na admissão ocorreram em 5,6% e 3,3% respectivamente onde havia a informação (153 casos de melanoma). Ulceração clinicamente detectável ocorreu em 62,5% dos 40 melanomas onde foi possível a avaliação (tumor primário presente).

Dezenove melanomas (12,4% dos que haviam a informação disponível) apresentavam metástases linfonodais clínicas na admissão, e a base linfonodal mais acometida foi a axila com 12 casos. Metástases linfonodais tiveram associação com nível de Clark ($p < 0,001$), índice de Breslow ($p = 0,002$), microssatelitose ($p = 0,027$), ulceração presente no exame histopatológico ($p = 0,024$), macrossatelitose ($p = 0,030$) e metástase em trânsito ($p = 0,001$).

Metástases sistêmicas já na admissão estavam presentes em apenas 1,3% dos casos (2 casos em 153) basicamente para pulmão e SNC. O

paciente com metástase em SNC foi de imediato encaminhado para tratamento neurocirúrgico vindo a falecer no pós operatório.

Tabela 1 - Características demográficas e clínicas

	n	%
Idade		
11-20	1	,6
21-30	11	7,1
31-40	21	13,5
41-50	22	14,2
51-60	37	23,9
61-70	32	20,6
71-80	22	14,2
81-90	7	4,5
91-100	2	1,3
Fototipo		
I	8	5,2
II	62	40,0
III	43	27,7
IV	29	18,7
V	13	8,4
VI	0	0
Sexo		
Masculino	54	34,6
Feminino	102	65,4
Procedência		
Zona urbana	127	82,5
Zona rural	27	17,5
Município de procedência		
Fortaleza	78	50,6
Outros	76	49,4
Profissão		
Agricultor	11	20,0
Outros	44	80,0
Instrução		
Analfabetos	16	12,0
Primário incompleto e completo	71	53,4
Secundário incompleto e completo	27	20,3
Nível superior incompleto, completo e pós-graduação	19	14,3

Cont/ Tabela 1

	n	%
Sítio anatômico		
Face e pescoço	22	14,1
Tronco	55	35,3
Braço/antebraço	23	14,7
Perna	28	17,9
Outros	28	17,9
Melanoma em área desnuda		
Não	104	66,7
Sim	52	33,3
Ulceração clinicamente evidente na admissão		
Não	15	37,5
Sim	25	62,5
Macrossateliteose na admissão		
Não	119	94,4
Sim	7	5,6
Sem informação	3	
Metástases em trânsito na admissão		
Não	147	96,7
Sim	5	3,3
Metástase linfonodal clínica na admissão		
Não	134	87,6
Sim	19	12,4
Metástase sistêmica admissão		
Não	151	98,7
Sim	2	1,3

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO TRATAMENTO

Cento e quarenta e nove melanomas foram submetidos a tratamento do melanoma primário no ICC. Pesquisa de linfonodo sentinela foi realizado em 59,7% dos casos e esvaziamento linfonodal radical como tratamento inicial foi indicado em 11% dos casos (em 154 casos disponível a informação).

Dos 92 casos submetidos a pesquisa de linfonodo sentinela, apenas um linfonodo sentinela foi identificado em 43,5% e até 3 linfonodos sentinelas em 92,4% dos casos. Linfonodos sentinelas foram negativos em 66 casos (71,7%). Em apenas um caso de linfonodo sentinela positivo, o esvaziamento de complementação da base linfonodal não foi realizado. Em 25 casos onde o esvaziamento foi indicado 24% (6 casos em 25) apresentaram linfonodos não sentinela positivos no esvaziamento de complementação. A presença de linfonodo sentinela positivo teve associação significativa com nível de Clark ($p=0,024$), invasão perineural ($p=0,014$) e índice de Breslow ($p=0,006$).

Dentre 152 casos onde a informação estava presente, apenas em 20 casos (13,2%) foi realizado algum tipo de tratamento adjuvante. Nestes 19, receberam radioterapia adjuvante e apenas três receberam Interferon alfa adjuvante. Nenhum caso foi tratado com quimioterapia, terapia alvo ou anticorpos monoclonais como adjuvância.

Durante o estudo, 29 melanomas apresentaram recidiva (18,7% de 155 casos avaliáveis), predominando a recidiva à distância em 22 casos (14,1% de 155 casos avaliáveis). Os sítios de metástases à distância foram: pulmão (31,8% dentro os sítios acometidos), SNC (27,2%), fígado (13%), partes moles (18,8%), retroperitônio (18,8%), osso (9%), linfonodos não regionais (9%) e estômago (apenas 1 caso). Em 15 casos cirurgia e radioterapia foram realizados para tratamento da recidiva. Quimioterapia foi realizada como tratamento da recidiva em 9 casos, em 3 casos a

Interleucina 2, em 2 casos o Ipilimumabe e em apenas 1 caso, o Vemurafenibe.

A sobrevida global variou nesta série de 0 a 165 meses (média de 138 meses), sendo que até o fechamento deste estudo e até a última informação, 121 pacientes estavam vivos, 111 deles sem evidência de doença até a última consulta.

Tabela 2 - Dados sobre tratamento e *follow up*

	n	%
Tratamento realizado (tumor primário)		
Não	6	3,9
Sim	149	96,1
Tratamento cirúrgico do sítio primário		
Não	7	4,5
Sim	147	95,5
Pesquisa cirúrgica de linfonodo sentinela		
Não	62	40,3
Sim	92	59,7
Esvaziamento radical como primeiro tratamento		
Não	137	89,0
Sim	17	11,0
Tratamento adjuvante		
Não	132	86,8
Sim	20	13,2
Radioterapia adjuvante		
Não	133	87,5
Sim	19	12,5
Interferon alfa adjuvante		
Não	149	98,0
Sim	3	2,0

Cont/ Tabela 2

	n	%
Recidiva		
Não	126	81,3
Sim	29	18,7
Recidiva local		
Não	152	98,7
Sim	2	1,3
Recidiva por metástases em trânsito		
Não	146	94,8
Sim	8	5,2
Recidiva na base linfonodal		
Não	148	96,1
Sim	6	3,9
Recidiva sistêmica		
Não	132	85,7
Sim	22	14,3
Cirurgia na recidiva		
Não	139	90,3
Sim	15	9,7
Radioterapia na recidiva		
Não	138	90,2
Sim	15	9,8
Quimioterapia na recidiva		
Não	144	94,1
Sim	9	5,9
Ipilimumabe na recidiva		
Não	151	98,7
Sim	2	1,3
Vemurafenibe na recidiva		
Não	152	99,3
Sim	1	,7
Estado na última consulta (pacientes)		
Vivo sem doença	111	77,6
Vivo com doença	10	7
Morte por melanoma	20	14
Sem informação	2	1,4

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

4.3 CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA

O laudo original de exame anatomopatológico (revisão realizada rotineiramente antes do tratamento) foi recuperado em 140 casos (89,7%). Nem todos os fatores prognósticos estavam presentes nos laudos.

Os subtipos histológicos de melanoma (informação presente em 138 laudos) foram: extensivo superficial (46,4%), nodular (15,2%), acral (14,5%), desmoplásico (2,2%) e spitzóide (0,7%) além de doze casos não classificáveis (8,7%). Melanomas *in situ* corresponderam a 12,3% sendo dentre destes 47% do tipo lentigo maligno e 53% melanoma *in situ* do tipo extensivo superficial. De 147 casos onde havia a informação, 68,7% dos casos invasivos eram Clark III e IV, sendo o Clark IV correspondendo a 32,5% de todos os 147 casos avaliados. Entre 125 casos avaliáveis (casos invasivos com informação), o índice de Breslow variou entre 0,1mm a 90mm com média de 5,6mm e mediana de 2,2mm. Ulceração estava presente ao exame histopatológico em 46,3% (121 casos avaliados) e microsatelitose em 9,6% dos casos. Índice mitótico igual ou maior que 1 estava presente em 88,6% dos 123 casos invasivos avaliados, mas alguns laudos traziam a informação mitoses por campo de grande aumento. Invasão vascular e perineural estavam presentes em 18,6% (121 casos avaliados) e 10,3% (117 casos avaliados) dos casos respectivamente. Infiltração linfocítica peritumoral estava ausente em apenas 11 casos (9,2% dos 119 casos avaliados) e infiltração linfocítica intratumoral estava ausente em apenas 31 casos (30,7% dos 101 casos avaliados). Fenômeno de regressão foi

registrado em 17 dos 118 casos (14,4%) onde a informação estava descrita. Apenas 8 nevos foram registrados como lesão associada em 98 laudos.

Algum grau de elastose solar foi observada em 73 casos (68,2% dos 107 avaliados). Elastose moderada a severa (considerando os critérios 1+,2-,2,2+,3-,3 e 3+ de LANDI et al. (2006) foi observada em 31,8% dos casos.

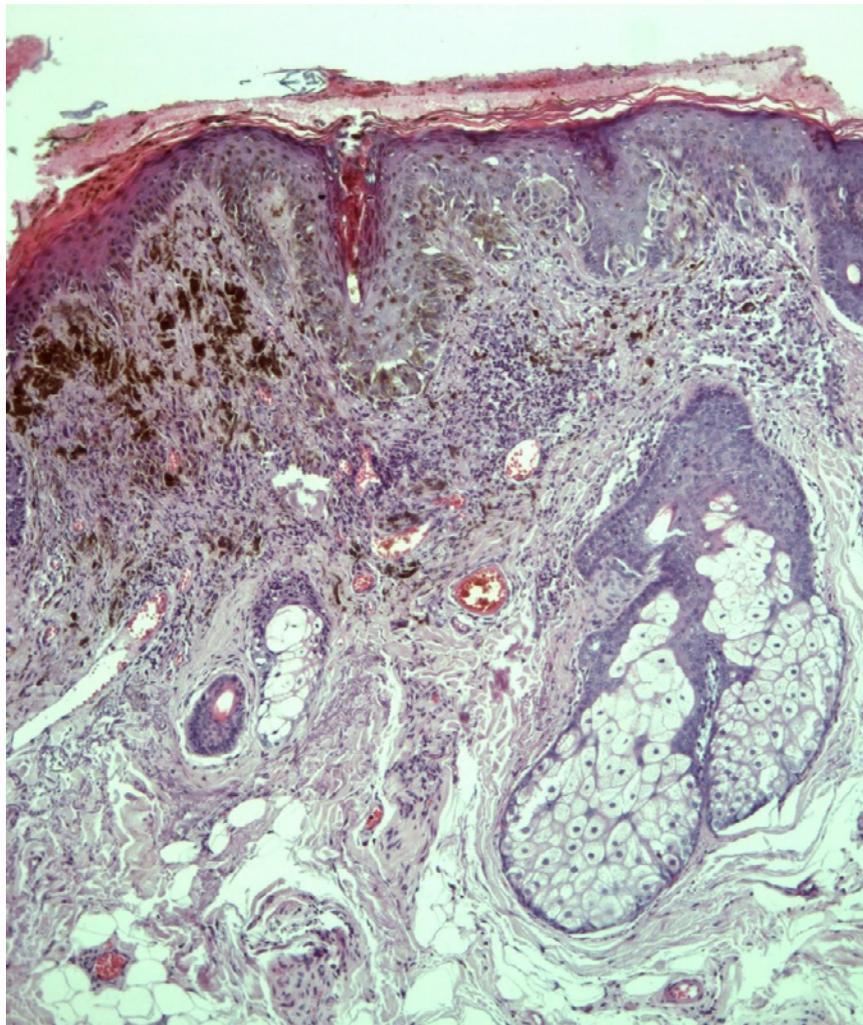


Figura 10 - Fotomicrografia: melanoma cutâneo. Faixa elastótica. Aumento 100X

Tabela 3 - Exame Anatomopatológico

	n	%
Tipo histológico		
Extensivo Superficial	64	46,4
Nodular	21	15,2
Acral Lentiginoso	20	14,5
Desmoplásico	3	2,2
Spitzóide	1	,7
Não Classificável	12	8,7
Extensivo Superficial in Situ	9	6,5
Lentigo Maligno (in Situ)	8	5,8
Total	138	100
Fase de crescimento		
Radial	21	16,3
Vertical	105	81,4
Vertical + Radial	3	2,3
Total	129	100
Nível de invasão - CLARK		
I	19	12,9
II	19	12,9
III	37	25,2
IV	51	34,7
V	21	14,3
Total	147	100
Espessura tumoral - BRESLOW		
Até 1mm	37	29,6
Entre 1-2mm	23	18,4
Entre 2-3mm	12	9,6
Entre 3-4mm	12	9,6
Mais de 4mm	41	32,8
Total	125	100
Infiltração linfocítica peritumoral		
Ausente	11	9,2
Leve	45	37,8
Moderada	53	44,5
Intensa	10	8,4
Total	119	100
Infiltração linfocítica intratumoral		
Ausente	31	30,7
Leve	50	49,5
Moderada	16	15,8
Intensa	4	4,0
Total	101	100
Invasão vascular		
Ausente	96	81,4
Presente	22	18,6
Total	118	100

Cont/ Tabela 3

	n	%
Invasão perineural		
Ausente	105	89,7
Presente	12	10,3
Total	117	100
Fenômeno de regressão		
Ausente	101	85,6
Presente	17	14,4
Total	118	100
Microssatelitose		
Ausente	104	90,4
Presente	11	9,6
Total	105	100
Ulceração		
Ausente	65	53,7
Presente	56	46,3
Total	121	100
Nevo Associado		
Ausente	90	91,8
Presente	8	8,2
Total	98	100
Elastose (critérios de LANDI et al., agrupados)		
0,0+ (ausente ou mínima)	53	49,5
1-,1 (leve)	20	18,7
1+,2-,2(moderada)	14	13,1
2+,3-,3,3+(intensa)	20	18,7
Total	107	100

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

4.4 CARACTERIZAÇÃO BIOMOLECULAR

Em 53 casos a pesquisa da mutação de *NRAS* Q61L (gera substituição da glutamina para leucina na posição 61) foi realizada com 10 ensaios inválidos e nenhuma mutação detectada. Em 47 casos a pesquisa

de mutação de *KIT* V559A (gera substituição da Valina pela Alanina na posição 559) foi realizada com 31 ensaios invalidados (70%) e nenhuma mutação detectada.

Em 62 casos a pesquisa de mutação *BRAF* V600E (gera substituição da Valina pelo Ácido Glutâmico na posição 600) foi pesquisada por RT-PCR utilizando-se os *kits* da empresa Life Technologies® e em 44 casos, a mesma mutação foi pesquisada no sistema COBAS da Roche®. Nos ensaios com plataforma aberta e uso de ensaios da Life Technologies® apenas 4 mutações foram detectadas, 2 resultados foram indeterminados (confirmados posteriormente como positivos no sistema COBAS®), 18 resultados foram negativos e 38 ensaios foram inválidos. Já no sistema COBAS® houveram 4 detecções de mutações, 15 amostras revelaram-se negativas e 25 amostras não validaram.

Considerando os resultados utilizando as duas técnicas (Life Technologies® e COBAS®) foram testadas para a mutação *BRAF* V600E 93 amostras (algumas amostras foram testadas nos dois sistemas). Destes 8 amostras detectaram a mutação *BRAF* V600E (18,6% dos ensaios validados), 35 foram negativas e em 50 amostras não houve amplificação (inválidas).

Tabela 4 – Resultados de mutações

<i>BRAF V600E</i> - Life Technologies®	n	%
Mutação detectada		
Sim	4	6,6
Não	20	32,3
Inválidos	38	61,1
Total	62	100
<i>NRAS Q61L</i> - Life Technologies®		
Sim	0	0
Não	43	81,1
Inválidos	10	18,9
Total	53	100
<i>KIT V559A</i> - Life Technologies®		
Sim	0	0
Não	16	32,7
Inválidos	31	67,3
Total	49	100
<i>BRAF V600E</i> - COBAS®		
Sim	4	9,1
Não	15	34,1
Inválidos	25	56,8
Total	44	100
<i>BRAF V600E</i> – amostras válidas - Life Technologies®		
Sim	4	16,7
Não	20	83,3
Total	24	100
<i>BRAF V600E</i> – amostras válidas - COBAS®		
Sim	4	21,1
Não	15	78,9
Total	19	100
<i>BRAF V600E</i> – amostras válidas - (análise consolidada – Life Technologies® e COBAS®)		
Sim	8	18,6
Não	35	81,4
Total	43	100

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

4.5 CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

Cento e uma amostras de melanomas cutâneos (64,7% dos casos) foram estudadas em blocos de TMA para expressão IHQ das proteína mutadas BRAF V600E, PTEN e p53.

A intensidade da expressão citoplasmática da proteína BRAF V600E foi classificada como negativa, positivo fraco, moderado e forte ou indeterminada (sem representatividade, perda do corte na lâmina ou indefinição entre pigmento melânico ou expressão da proteína). Dos 101 casos avaliados, oito casos foram indeterminados (7,9%). Sessenta e três casos não demonstraram expressão IHQ da proteína BRAF mutada (67,7%, excluídos os indeterminados).

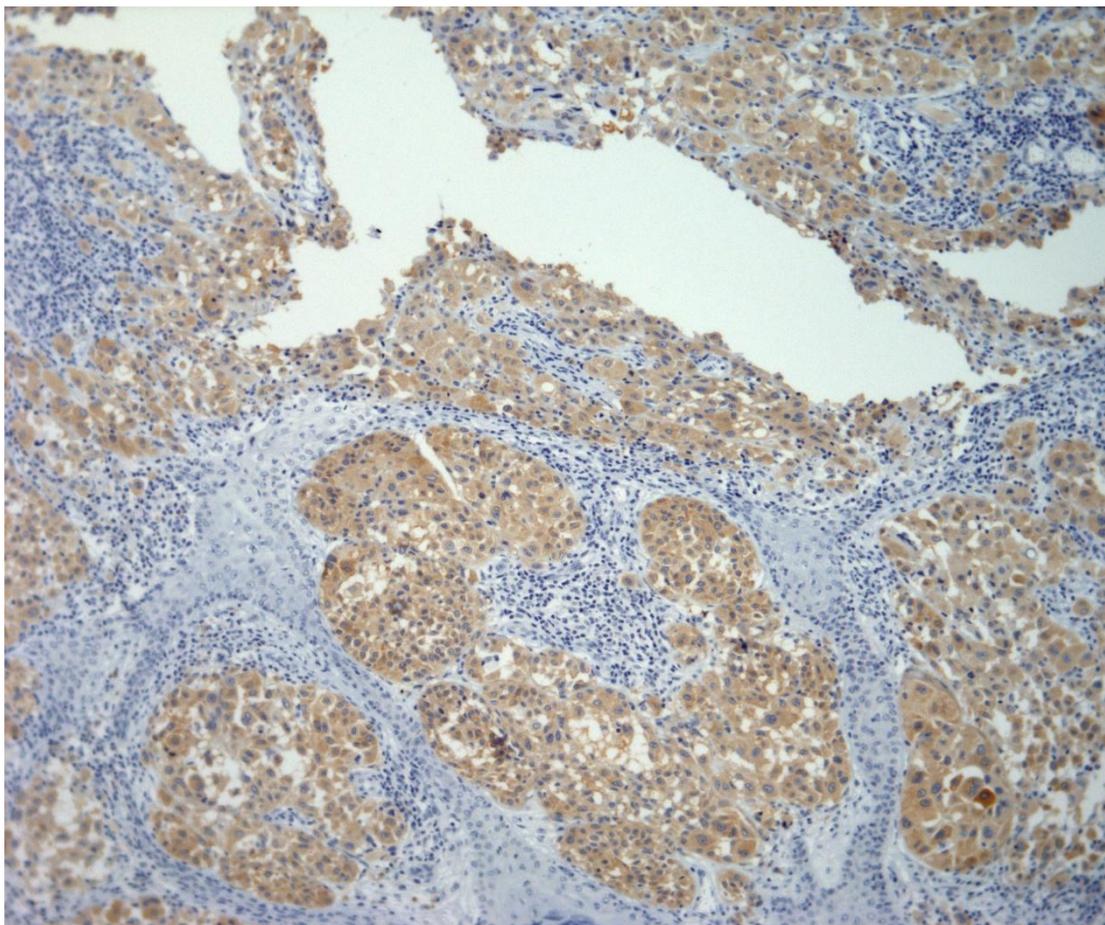


Figura 11 – Fotomicrografia: melanoma cutâneo com forte imunoposição citoplasmática de BRAF V600E. Aumento 100X

A intensidade da expressão citoplasmática da proteína PTEN foi negativa em apenas 15 casos (17%, excluídos os indeterminados). Dos 101 casos avaliados, 13 casos não puderam ser avaliados (12,9%).

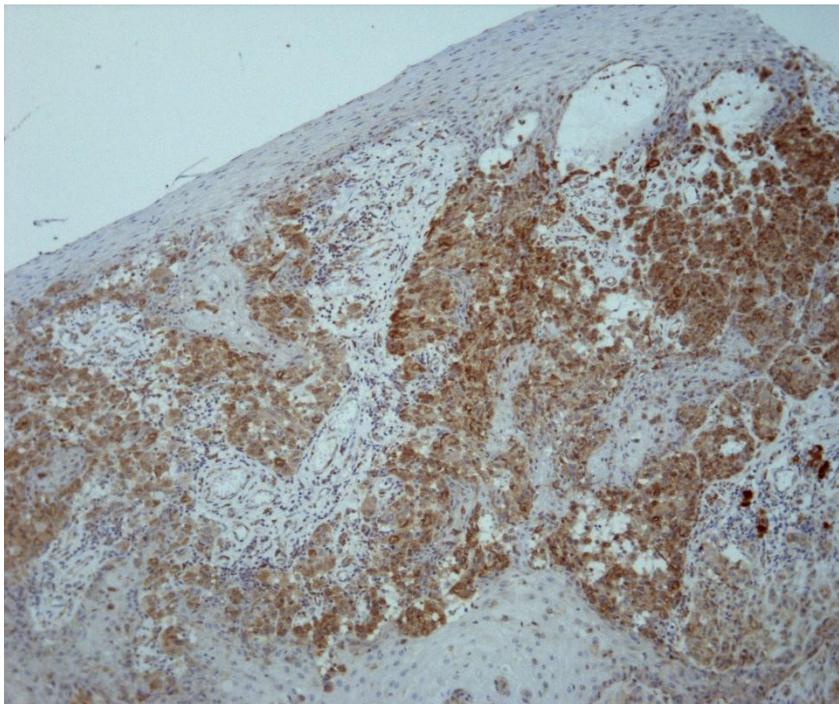


Figura 12 - Fotomicrografia: melanoma cutâneo com forte imunoexpressão citoplasmática de PTEN. Aumento 100X

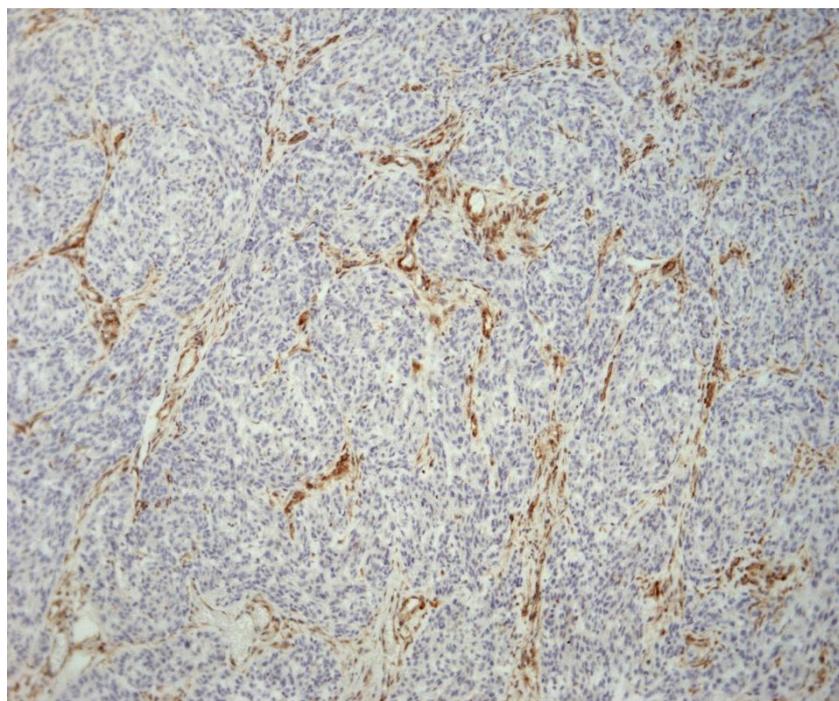


Figura 13 - Fotomicrografia: melanoma cutâneo. Ausência de imunoexpressão de PTEN. Aumento 100X

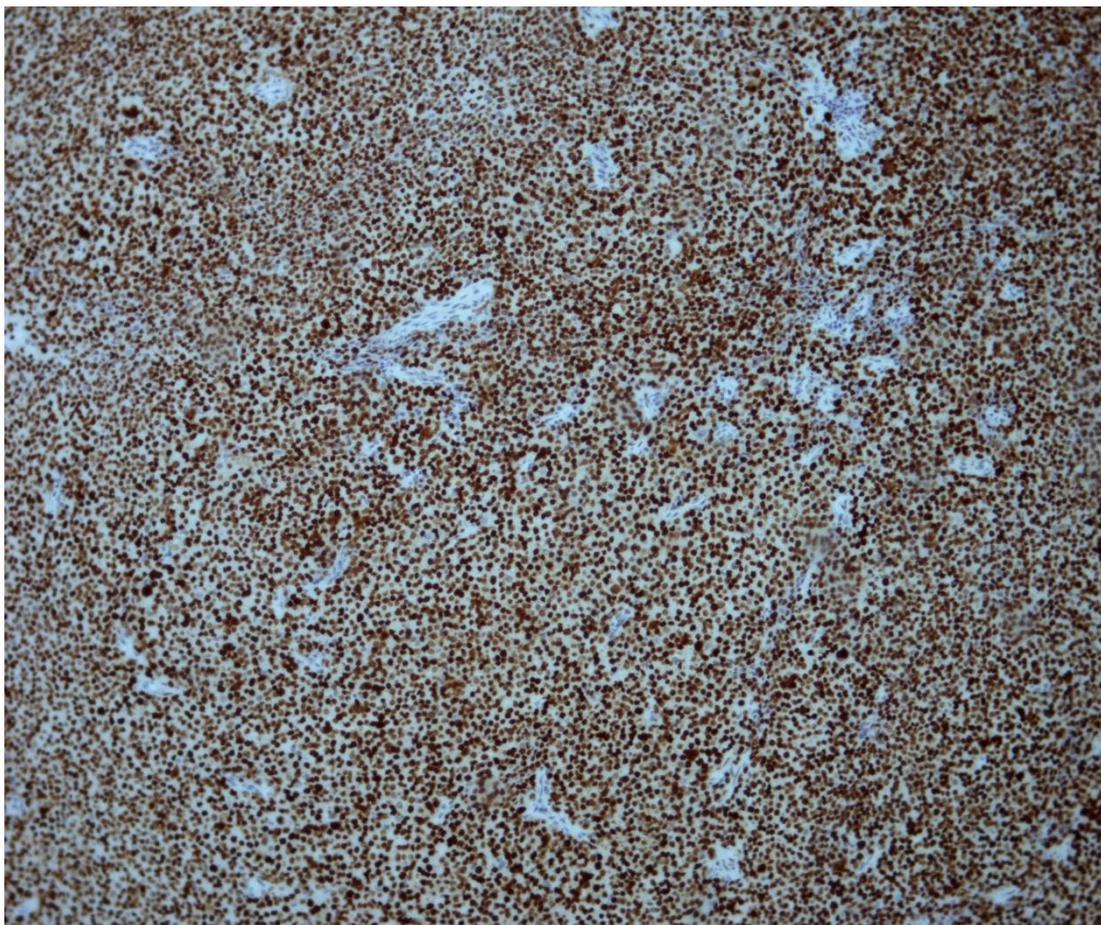


Figura 14 - Fotomicrografia: melanoma com forte imunopositividade nuclear de p53 em 100% das células tumorais. Aumento 100X

A grande maioria dos casos avaliados teve alguma expressão nuclear de p53. Apenas em 18 casos (20%, excluídos os indeterminados) dos casos não apresentaram expressão IHQ de p53. Dos 101 casos avaliados, 11 casos não puderam ser avaliados (10,9%). Cinquenta e quatro casos (60%, excluídos os indeterminados) tiveram expressão IHQ percentual da área tumoral até 10%; 27 casos (30%, excluídos os indeterminados) tiveram expressão IHQ acima de 30% e 18 casos (20%, excluídos os indeterminados) tiveram expressão acima de 50% da área tumoral.

Tabela 5 - Resultados de Imunoistoquímica

	n	%
IHQ - BRAF V600E		
Negativo	63	67,7
Positivo fraco	21	22,6
Positivo moderado	7	7,5
Positivo forte	2	2,2
Total	93	100,0
IHQ-PTEN		
Negativo	15	17,0
Positivo fraco	16	18,2
Positivo forte	57	64,8
Total	88	100,0
IHQ-p53		
0-1%	19	21,1
2-10%	17	18,9
11-30%	26	28,9
31-50%	10	11,1
>50%	18	20
Total	90	100

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

4.6 ASSOCIAÇÕES CLINICOPATOLÓGICAS E BIOMOLECULARES

4.6.1 Idade

A idade categorizada por décadas associou-se significativamente com os parâmetros instrução (associação inversa), presença de metástase em trânsito na admissão, *status BRAF V600E* e expressão IHQ de BRAF V600E. Não houve associação com o sítio anatômico.

Considerando sítio anatômico categorizado como face e pescoço, tronco, membros e acrais, não houve associação significativa.

A presença de mutação *BRAF* V600E e expressão imunohistoquímica *BRAF* V600E foi mais frequente entre os jovens. Não houve associação estatisticamente significativa com fototipo, sexo, presença de ulceração observada clinicamente na admissão, presença de satelitose na admissão, presença de metástase linfonodal na admissão, estadiamento T, expressão IHQ percentual de p53 e todos parâmetros histopatológicos avaliados.

Tabela 6 - Idade vs nível de instrução

	idade									p-valor
	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100	
Analfabeto	0	0	2	0	3	1	6	3	1	p=0,001
	,0%	,0%	12,5%	,0%	18,8%	6,3%	37,5%	18,8%	6,3%	
1º Grau Incompleto	0	1	3	2	3	8	0	2	0	
1º Grau Completo	,0%	5,3%	15,8%	10,5%	15,8%	42,1%	,0%	10,5%	,0%	
2º Grau Incompleto	0	6	4	9	14	9	10	0	0	
2º Grau completo	,0%	11,5%	7,7%	17,3%	26,9%	17,3%	19,2%	,0%	,0%	
Superior Incompleto	1	0	1	0	4	0	1	0	0	
Superior Completo	14,3%	,0%	14,3%	,0%	57,1%	,0%	14,3%	,0%	,0%	
Pós-graduação	0	0	4	7	2	5	0	2	0	
	,0%	,0%	20,0%	35,0%	10,0%	25,0%	,0%	10,0%	,0%	
	0	0	2	1	0	0	0	0	0	
	,0%	,0%	66,7%	33,3%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	
	0	3	2	1	4	3	1	0	0	
	,0%	21,4%	14,3%	7,1%	28,6%	21,4%	7,1%	,0%	,0%	
	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
	,0%	,0%	50,0%	,0%	,0%	,0%	50,0%	,0%	,0%	
Total	1	10	19	20	30	26	19	7	1	
	,8%	7,5%	14,3%	15,0%	22,6%	19,5%	14,3%	5,3%	,8%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher. Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 7 - Idade vs sítio anatômico

		idade									p valor
Sitio anatomico		11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100	
face e pescoço		1	1	1	1	4	8	3	2	0	p=0,142
		4,8%	4,8%	4,8%	4,8%	19,0%	38,1%	14,3%	9,5%	,0%	
	tronco	0	5	5	10	16	12	6	1	0	
		,0%	9,1%	9,1%	18,2%	29,1%	21,8%	10,9%	1,8%	,0%	
membros		0	4	13	8	8	7	7	3	1	
		,0%	7,8%	25,5%	15,7%	15,7%	13,7%	13,7%	5,9%	2,0%	
acral		0	1	2	3	9	5	6	1	1	
		,0%	3,6%	7,1%	10,7%	32,1%	17,9%	21,4%	3,6%	3,6%	
Total		1	11	21	22	37	32	22	7	2	
		,6%	7,1%	13,5%	14,2%	23,9%	20,6%	14,2%	4,5%	1,3%	

Tabela 8 - Idade vs metástase em trânsito na apresentação

	idade									p-valor p=0,021
	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100	
Não	1 ,7%	11 7,5%	20 13,6%	21 14,3%	34 23,1%	30 20,4%	22 15,0%	7 4,8%	1 ,7%	
Sim	0 ,0%	0 ,0%	0 ,0%	0 ,0%	2 40,0%	2 40,0%	0 ,0%	0 ,0%	1 20,0%	
Total	1 ,7%	11 7,2%	20 13,2%	21 13,8%	36 23,7%	32 21,1%	22 14,5%	7 4,6%	2 1,3%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher. Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 9 - Idade vs *status* mutação *BRAF* V600E

	idade								p-valor p=0,018
	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100	
Negativo	2 5,7%	2 5,7%	5 14,3%	6 17,1%	13 37,1%	7 20,0%	0 ,0%	0 ,0%	
Positivo	1 12,5%	2 25,0%	2 25,0%	1 12,5%	0 ,0%	0 ,0%	1 12,5%	1 12,5%	
Total	3 7,0%	4 9,3%	7 16,3%	7 16,3%	13 30,2%	7 16,3%	1 2,3%	1 2,3%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher. Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 10 - Idade vs expressão IHQ de BRAF V600E

	idade								p-valor p=0,006
	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100	
NEGATIVO	1 1,6%	7 11,1%	7 11,1%	18 28,6%	14 22,2%	14 22,2%	2 3,2%	0 ,0%	
POSITIVO	6 20,0%	7 23,3%	5 16,7%	4 13,3%	5 16,7%	2 6,7%	0 ,0%	1 3,3%	
Total	7 7,5%	14 15,1%	12 12,9%	22 23,7%	19 20,4%	16 17,2%	2 2,2%	1 1,1%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher. Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

4.6.2 Sexo

O sexo associou-se significativamente com os parâmetros instrução, sítio anatômico, expressão imunoistoquímica de BRAF V600E. Mesmo não alcançando significância estatística o *status* da mutação *BRAF* V600E foi mais frequente entre as mulheres (87,5%; $p=0,067$). Nenhuma associação estatisticamente significativa houve com fototipo, idade, instrução, presença de ulceração observada clinicamente na admissão, presença de satelitose na admissão, presença de metástase em trânsito na admissão, presença de metástase linfonodal na admissão, estadió T, expressão IHQ percentual de p53 e todos parâmetros histopatológicos avaliados.

Tabela 11 - Sexo vs sítio anatômico

	Sexo		p-valor $p=0,001$
	Masculino	Feminino	
Face e pescoço	12 57,1%	9 42,9%	
Tronco	19 33,9%	37 66,1%	
Membros	8 15,7%	43 84,3%	
Acral	15 53,6%	13 46,4%	

$p<0,05$, teste qui-quadrado ou exato de Fisher.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 12 - Sexo vs status da mutação *BRAF* V600E

	Sexo		p-valor p=0,067
	Masculino	Feminino	
Negativo	17 48,6%	18 51,4%	
Positivo	1 12,5%	7 87,5%	
Total	18 41,9%	25 58,1%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 13 - Sexo vs expressão IHQ de *BRAF* V600E

	Sexo		p-valor p=0,036
	Masculino	Feminino	
NEGATIVO	29 46,0%	34 54,0%	
POSITIVO	7 23,3%	23 76,7%	
Total	36 38,7%	57 61,3%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

4.6.3 Fototipo

O fototipo teve associação inversa significativa com os parâmetros infiltração linfocítica peritumoral e expressão IHQ percentual de p53. Quase metade (47,4%) dos melanomas com expressão IHQ de p53 até 1% da área tumoral eram em pacientes fototipo IV e 42,9% dos melanomas com expressão IHQ de p53 acima de 1% eram em pacientes fototipos II. Não houve associação com o *status BRAF* V600E nem com a expressão IHQ de *BRAF* V600E. Nenhum outro parâmetro clínico, demográfico e anatomopatológico teve associação significativa com o fototipo da pele.

Tabela 14 - Fototipo vs *status* da mutação *BRAF* V600E

	Fototipo					p-valor p=0,062
	I	II	III	IV	V	
Negativo	1 2,9%	20 57,1%	4 11,4%	5 14,3%	5 14,3%	
Positivo	1 12,5%	2 25,0%	4 50,0%	1 12,5%	0 ,0%	
Total	2 4,7%	22 51,2%	8 18,6%	6 14,0%	5 11,6%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 15 - Fototipo vs porcentagem de expressão IHQ de p53

	Fototipo					p-valor p=0,037
	I	II	III	IV	V	
0-1%	0 ,0%	6 31,6%	3 15,8%	9 47,4%	1 5,3%	
ACIMA DE 1%	2 2,9%	30 42,9%	20 28,6%	10 14,3%	8 11,4%	
Total	2 2,2%	36 40,4%	23 25,8%	19 21,3%	9 10,1%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 16 - Fototipo vs infiltração linfocítica peritumoral

	Fototipo					p-valor p=0,044
	I	II	III	IV	V	
Ausente	0 ,0%	2 18,2%	4 36,4%	2 18,2%	3 27,3%	
Leve	2 4,4%	17 37,8%	6 13,3%	13 28,9%	7 15,6%	
Moderada	4 7,5%	22 41,5%	19 35,8%	7 13,2%	1 1,9%	
Intensa	0 ,0%	4 44,4%	2 22,2%	3 33,3%	0 ,0%	
	6 5,1%	45 38,1%	31 26,3%	25 21,2%	11 9,3%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

4.6.4 Mutação V600E do gene *BRAF*

O *status* da mutação *BRAF* V600E teve associação significativa com sítio anatômico (tronco vs não tronco), com a idade categorizada por décadas e com a expressão IHQ da proteína mutada *BRAF* V600E. Para todos os melanomas localizados no tronco, nenhuma mutação *BRAF* V600E foi detectada. Cinco (62,5%) das mutações ocorreram até os 50 anos de idade. Nenhum outro parâmetro clínico, demográfico ou histopatológico teve associação significativa. Mutações *BRAF* V600E foram mais frequentes no fototipo III ($p=0,062$). Embora 7 das 8 mutações tenham sido detectadas entre as mulheres, não houve associação significativa ($p=0,067$). Não houve associação significativa com a expressão IHQ de PTEN.

Tabela 17 - *Status* da mutação *BRAF* V600E vs idade

	<i>BRAF</i> V600E		p-valor p=0,018
	Negativo	Positivo	
21-30	2 66,7%	1 33,3%	
31-40	2 50,0%	2 50,0%	
41-50	5 71,4%	2 28,6%	
51-60	6 85,7%	1 14,3%	
61-70	13 100,0%	0 ,0%	
71-80	7 100,0%	0 ,0%	
81-90	0 ,0%	1 100,0%	
91-100	0 ,0%	1 100,0%	
Total	35 81,4%	8 18,6%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 18 - Status da mutação *BRAF* V600E vs sítio anatômico

	<i>BRAF</i> V600E		p-valor p=0,040
	Negativo	Positivo	
Não-tronco	22 73,3%	8 26,7%	
Tronco	13 100,0%	0 ,0%	
Total	35 81,4%	8 18,6%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 19 - Status da mutação *BRAF* V600E vs expressão IHQ de *BRAF* V600E

	<i>BRAF</i> V600E		p-valor p=0,032
	Negativo	Positivo	
NEGATIVO	27 90,0%	3 10,0%	
POSITIVO FRACO	2 50,0%	2 50,0%	
POSITIVO MODERADO	4 80,0%	1 20,0%	
POSITIVO FORTE	0 ,0%	1 100,0%	
Total	33 82,5%	7 17,5%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

4.6.5 Expressão Imunoistoquímica de *BRAF* V600E

A expressão IHQ da proteína *BRAF* V600E (negativo, fraca, moderado e forte expressão) teve associação significativa com o parâmetro idade categorizado por até 50 anos e acima dos 50 anos (p=0,003) e com o *status* mutacional *BRAF* V600E (p=0,032). Aproximadamente 76% entre os negativos tinham idade superior a 50 anos e 60% entre os positivos tinham até 50 anos de idade. Considerando categoricamente a expressão de *BRAF* V600E positivo ou negativo, mantém-se a associação inversa com idade (p=0,006) e passa a haver associação com sexo (p=0,036), associação inversa elastose agrupada (p=0,028) e tipo histológico (p=0,021).

Apresentavam expressão IHQ de BRAF V600E aproximadamente 28% dos melanomas do tipo extensivo superficial, 70% dos melanomas nodulares e 20% dos melanomas acrais.

Ao categorizar esta variável em positiva e negativa, perde-se a significância estatística para o *status* da mutação *BRAF* V600E. Comparando-se a expressão da proteína mutada BRAF V600E com o exame padrão estado da mutação genética ao RT-PCR observa-se de sensibilidade de 57%, especificidade de 81,8% e acurácia de 77,5%.

Tabela 20 - Expressão de BRAF V600E vs idade

	expressão de BRAF V600E		p-valor p=0,001
	NEGATIVO	POSITIVO	
Até 50 anos	15 45,5%	18 54,5%	
Mais de 50 anos	48 80,0%	12 20,0%	
Total	63 67,7%	30 32,3%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 21 - Expressão de BRAF V600E vs elastose agrupada

	expressão de BRAF V600E		p-valor p=0,028
	NEGATIVO	POSITIVO	
0, 0+	26 61,9%	16 38,1%	
1-, 1	8 50,0%	8 50,0%	
1+, 2-, 2	10 76,9%	3 23,1%	
2+, 3-, 3, 3+	12 100,0%	0 ,0%	
Total	56 67,5%	27 32,5%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 22 - Expressão de BRAF V600E vs sexo

	expressão de BRAF V600E		p-valor p=0,029
	NEGATIVO	POSITIVO	
Masculino	29 80,6%	7 19,4%	
Feminino	34 59,6%	23 40,4%	
Total	63 67,7%	30 32,3%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 23 - Expressão de BRAF V600E vs *status* da mutação *BRAF V600E*

	expressão de BRAF V600E		p-valor p=0,052
	NEGATIVO	POSITIVO	
Negativo	27 81,8%	6 18,2%	
Positivo	3 42,9%	4 57,1%	
Total	30 75,0%	10 25,0%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

4.6.6 Expressão imunoistoquímica de PTEN

A expressão IHQ de PTEN (positivo ou negativo) teve associação significativa apenas com sítio anatômico (p=0,043) categorizado como cabeça e pescoço (positividade em 58,3%), tronco (positividade em 83,9%) e membros (positividade em 88,9%). Quando categorizada em negativo, positivo fraco e positivo forte, a expressão IHQ de PTEN teve associação direta com a presença de microssatelitose.

Não houve associação da expressão IHQ de PTEN com o *status BRAF V600E*. No entanto quando categorizada para negativo, positivo fraco e positivo forte há associação significativa com a expressão de BRAF V600E

categorizada como negativo, positivo fraco e positivo forte. Em todos os casos de forte imunexpressão de BRAF V600E houve forte imunexpressão de PTEN ($p=0,028$).

4.6.7 Expressão imunoistoquímica de p53

A expressão IHQ nuclear de p53 teve associação variável com os parâmetros clínicos e demográficos a depender da categorização do percentual área tumoral expressando a proteína.

Utilizando-se a categorização de porcentagem de p53 em 2 categorias (até 10% da área tumoral ou acima de 10%) houve associação com o sítio anatômico categorizado em face e pescoço, tronco, membros e acral. A expressão de p53 acima de 50% cai de quase 50% dos casos de melanomas de cabeça e pescoço para 25% em tronco e quase 11% nos membros. A expressão de p53 categorizada até 1% das células tumorais cresce no sentido de apenas 8,3% dos casos em cabeça e pescoço para 26% em membros.

Tabela 24 - p53 vs sítio anatômico

	porcentagem de p53		p valor
	0-10%	>10%	
Face e pescoço	1 9,1%	10 90,9%	p=0,017
Tronco	10 30,3%	23 69,7%	
Membros	14 50%	14 50%	
Acral	11 61,1%	7 38,9%	
Total	36 40%	54 60%	

$p < 0,05$, teste qui-quadrado ou exato de Fisher.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Quase 92% dos melanomas na face e pescoço apresentaram mais de 10% da área tumoral positiva para p53. A infiltração linfocítica teve associação significativa ($p=0,036$) com um maior número de casos expressando p53 em até 10% da área tumoral não apresentando infiltração linfocítica intratumoral. Da mesma forma o critério invasão vascular passa a ter uma associação significativa ($p=0,045$) com quase 60% dos melanomas com expressão de p53 até 10% apresentando invasão vascular.

Tabela 25 - p53 vs infiltração linfocítica intratumoral

	porcentagem de p53		p-valor p=0,036
	0-10%	>10%	
Ausente	11 61,1%	7 38,9%	
Leve	13 34,2%	25 65,8%	
Moderada	1 10,0%	9 90,0%	
Intensa	2 66,7%	1 33,3%	
Total	27 39,1%	42 60,9%	

$p<0,05$, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 26 - p53 vs invasão vascular

	porcentagem de p53		p-valor p=0,045
	0-10%	>10%	
Ausente	19 32,2%	40 67,8%	
Presente	11 57,9%	8 42,1%	
Total	30 38,5%	48 61,5%	

$p<0,05$, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Ao se analisar a porcentagem de p53 categorizada em expressão IHQ até 30% e acima de 30% da área tumoral aparece uma associação significativa com a positividade de linfonodo sentinela ($p=0,047$) nos pacientes sem doença linfonodal clínica na admissão. Mais de 80% dos melanomas cutâneos com expressão IHQ de p53 até 30% tiveram linfonodo sentinela negativo.

Tabela 27 - p53 vs linfonodo sentinela

	porcentagem de p53		p-valor
	0-30%	>30%	
linfonodo sentinela	33	8	p=0,047
negativo	80,5%	19,5%	
linfonodo sentinela	10	8	
positivo	55,6%	44,4%	
Total	43	16	
	72,9%	27,1%	

$p<0,05$, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Analisando-se vários parâmetros clínicos, demográficos, histopatológicos e biomoleculares, utilizando a categorização de porcentagem de p53 em expressão IHQ até 1% e acima de 1% da área tumoral, passaram a ter significância como associação inversa o fototipo da pele ($p=0,037$), a invasão perineural ($p=0,027$), recidiva ($p=0,009$) e recidiva sistêmica ($p=0,016$). Aproximadamente 18,3% dos melanomas com expressão de p53 acima de 1% apresentaram algum tipo de recidiva enquanto que 47,4% com imunoexpressão de p53 até 1% recidivaram. Aproximadamente 37% dos melanomas com menos de 1% de expressão de

p53 apresentaram metástases à distância durante acompanhamento, enquanto que apenas 12,9% dos melanomas com imunoposição acima de 1% apresentaram recidiva sistêmica.

Todos os melanomas em pele fototipo I e mais de 80% dos melanomas em pele fototipos II e III apresentavam expressão IHQ de p53 acima de 1%. Pouco mais da metade dos melanomas em pele fototipo IV apresentavam imunoposição de p53 acima de 1%. Dentre os melanomas com imunoposição de p53 acima de 1%, 74,3% eram em pele fototipos I a III.

Tabela 28 - p53 vs fototipo

	porcentagem de p53		p-valor p=0,037
	0-1%	ACIMA DE 1%	
Fototipo I	0 ,0%	2 100,0%	
Fototipo II	6 16,7%	30 83,3%	
Fototipo III	3 13,0%	20 87,0%	
Fototipo IV	9 47,4%	10 52,6%	
Fototipo V	1 11,1%	8 88,9%	
Total	19 21,3%	70 78,7%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 29 - p53 vs invasão perineural

	porcentagem de p53		p-valor
	0-1%	ACIMA DE 1%	
Ausente	11 16,4%	56 83,6%	p=0,027
Presente	5 45,5%	6 54,5%	
Total	16 20,5%	62 79,5%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 30 - p53 vs recidiva sistêmica

	porcentagem de p53		p-valor
	0-1%	ACIMA DE 1%	
Não	12 16,4%	61 83,6%	p=0,016
Sim	7 43,8%	9 56,3%	
Total	19 21,3%	70 78,7%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

4.7 ANÁLISES DE SOBREVIDA

Aproximadamente 48% de todos os casos foram incluídos no estudo antes do início do tratamento. A soma destes casos com aqueles incluídos dentro do primeiro ano de tratamento corresponde a pouco mais de 77% da casuística.

A sobrevida global de todos os casos foi de 138 meses e a sobrevida mediana não foi atingida. Os fatores clínico-patológicos que influenciaram significativamente (teste de Log Rank p<0,05) a sobrevida em análise

univariada foram: ulceração clinicamente evidente na admissão, macrossateliteose na admissão, metástase em trânsito na admissão, metástase linfonodal na admissão, linfonodo sentinela positivo (pacientes clinicamente N0), ocorrência de recidiva, ocorrência de recidiva sistêmica, tipo histológico, índice de Breslow, nível de Clark e ulceração ao exame histopatológico. Considerando apenas a ocorrência de recidiva, a sobrevida global para os que apresentaram recidiva foi de aproximadamente 57 meses enquanto para os casos onde não houve recidiva a sobrevida global foi de aproximadamente 160 meses.

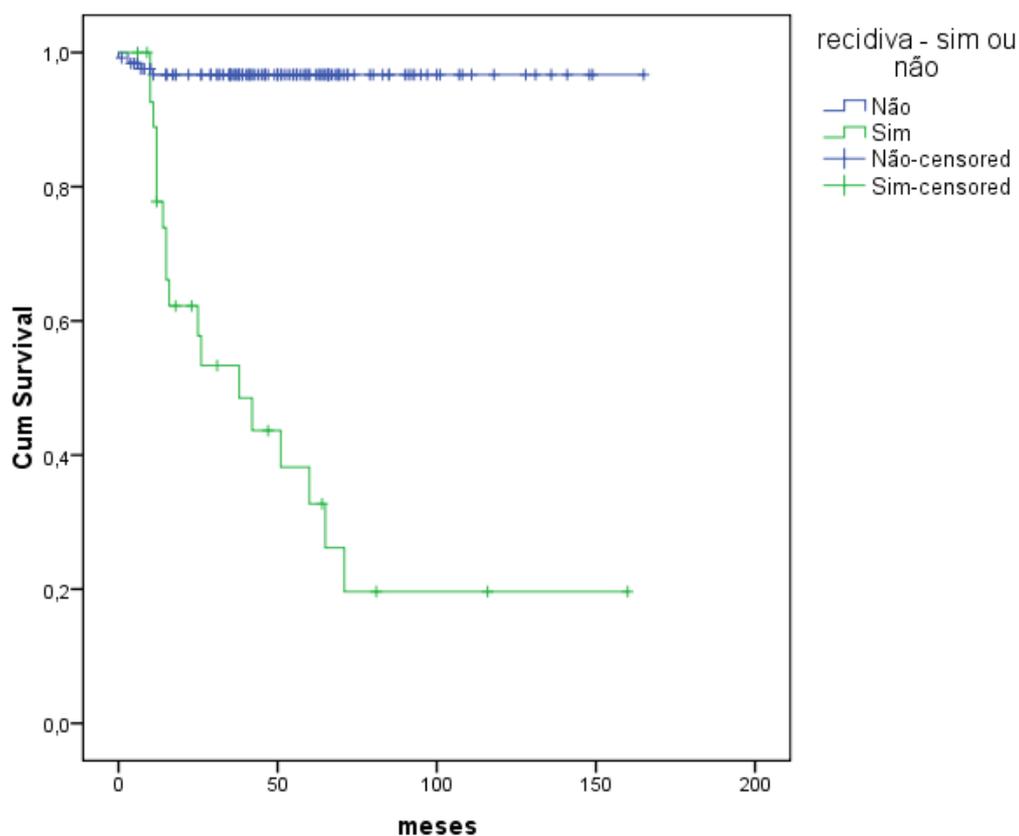


Figura 15 - Sobrevida global - ocorrência de recidiva (Log Rank $p < 0,001$)

Entre os parâmetros biomoleculares e imunoistoquímicos, *status* da mutação *BRAF* V600E, expressão IHQ de *BRAF* V600E, expressão IHQ de *PTEN* e porcentagem de expressão IHQ de p53, estudados por análise univariada, apenas a porcentagem de expressão IHQ de p53 categorizado como até 1% e acima de 1% da área tumoral, alcançou a significância estatística. A sobrevida global dos melanomas onde a expressão de p53 ocupava até 1% da área tumoral foi de aproximadamente 67 meses enquanto para os melanomas com área tumoral expressando acima de 1% foi de aproximadamente 82 meses. Mais de 84% dos casos de melanomas com imunoexpressão de p53 acima de 1% da área tumoral ocorreram em pacientes que estavam vivos ao final do estudo enquanto que 42% dos melanomas com expressão IHQ de p53 abaixo de 1% ocorreram em pacientes que vieram a óbito ($p=0,012$). No entanto, a análise multivariada da sobrevida global, considerando em conjunto os fatores índice de Breslow, nível de Clark, tipo histológico e ulceração, a expressão de p53 não atingiu a significância estatística como fator independente.

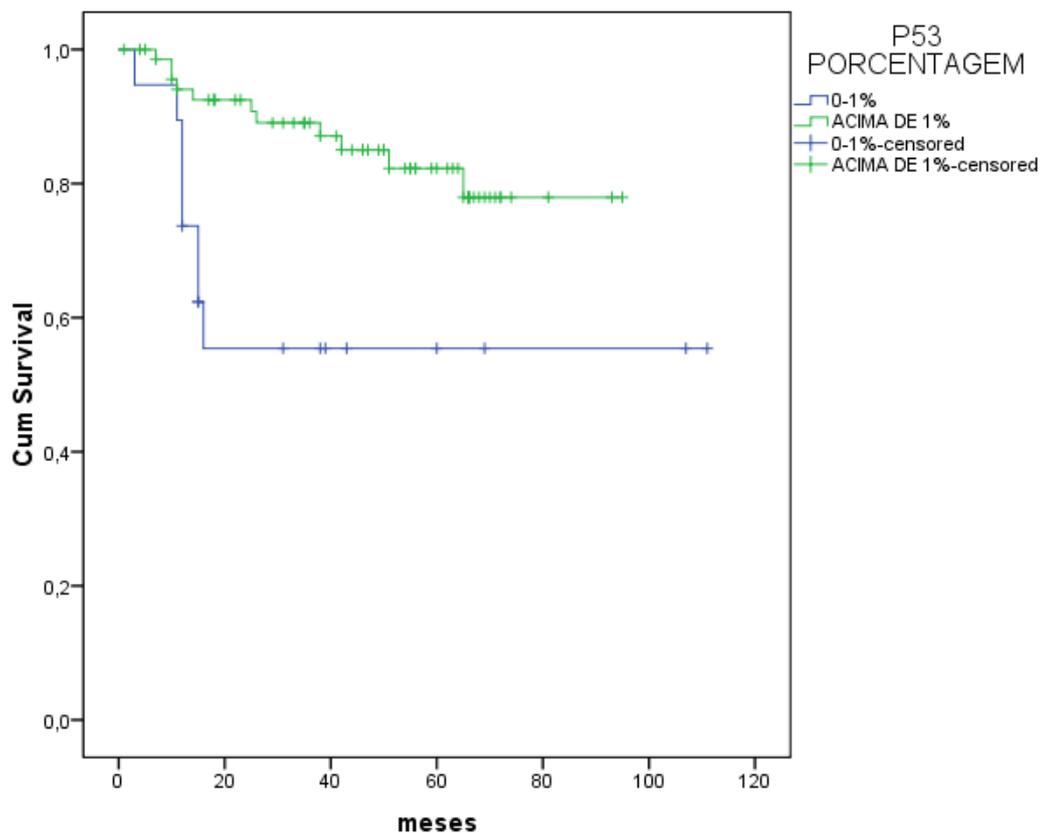


Figura 16 - Sobrevida global – porcentagem de expressão IHQ de p53 (Log Rank $p=0,005$)

A recidiva foi significativamente associada ($p<0,05$) com as variáveis anatomopatológicas: tipo histológico, nível de Clark, índice de Breslow, infiltração linfocítica peritumoral (associação inversa), invasão vascular, invasão perineural, ulceração, porcentagem de expressão IHQ de p53 categorizado para até 1% e acima de 1% da área tumoral. Entre os casos que não recidivaram, apenas 17,2% apresentavam área tumoral positiva para p53 menor que 1% e mais da metade (52,6%) entre os que apresentavam expressão menor que 1% apresentaram recidiva. A média de sobrevida livre de recorrência foi de 130 meses e a mediana não foi atingida.

A análise univariada da sobrevida livre de recorrência para os fatores tipo histológico, nível de Clark, índice de Breslow, infiltração linfocítica peritumoral (associação inversa), invasão vascular, invasão perineural, ulceração e porcentagem de expressão IHQ de p53 categorizado para até 1% e acima de 1% da área tumoral revelou significância estatística ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa na análise univariada de sobrevida livre de recorrência (Kaplan-Meier) para os fatores *status BRAF V600E*, imuno expressão de BRAF V600E e PTEN. A sobrevida livre de recorrência para melanomas com até 1% de área tumoral com expressão de p53 teve média de aproximadamente 59 meses contra 79 meses para tumores com expressão IHQ de p53 acima de 1%. Na análise multivariada, a porcentagem de expressão IHQ de p53 (até 1% vs acima de 1%) manteve impacto significativo como fator independente quando considerado os fatores nível de Clark, índice de Breslow e tipo histológico ($p = 0,012$; *Hazard risk* = 0,311; Intervalo de confiança: 0,126 a 0,77).

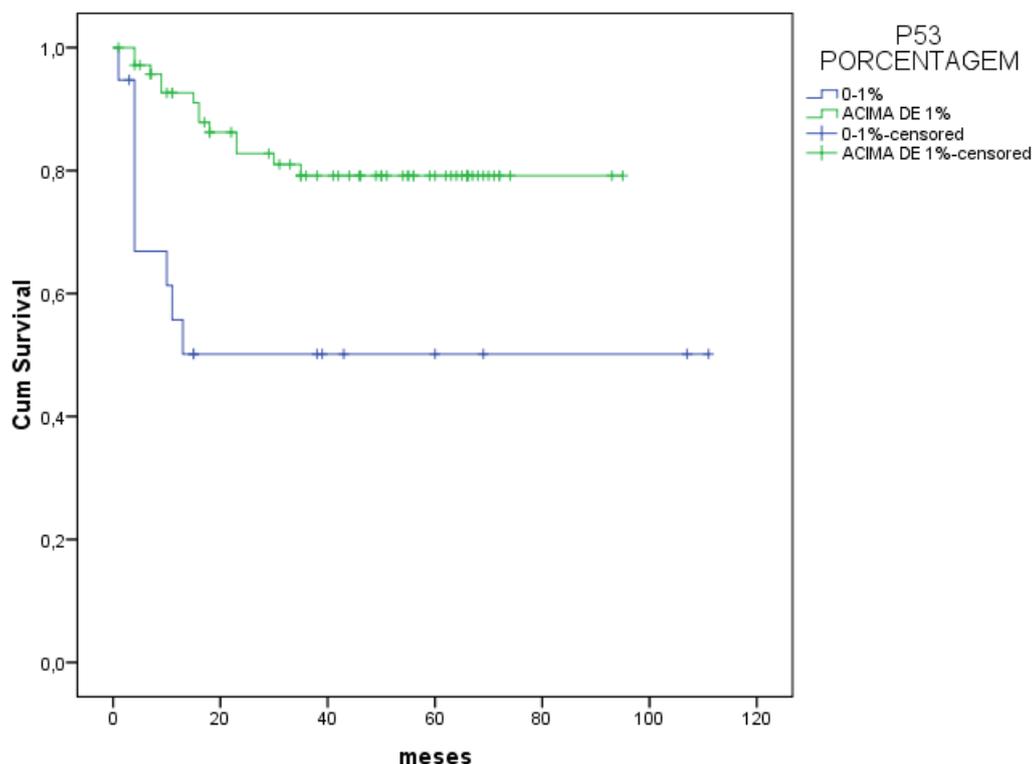


Figura 17 - sobrevida livre de recorrência - porcentagem de expressão IHQ de p53 (Log Rank $p=0,001$)

4.8 COMPARAÇÃO ENTRE AS POPULAÇÕES – ENSAIOS VÁLIDOS, INVÁLIDOS E NÃO REALIZADOS (MUTAÇÃO *BRAF* V600E)

Das 156 amostras de melanoma cutâneo primário, em apenas 93 casos (59,6%) foi possível a obtenção de bloco de parafina com material suficiente para tentativa de extração de DNA para análises biomoleculares por RT-PCR. Muitos blocos utilizados eram provenientes de outros laboratórios (ao todo 27 laboratórios diferentes) em guarda do ICC após revisão de exame anatomopatológico, rotina assistencial daquele hospital.

Vários parâmetros clínicos, demográficos e histopatológicos foram comparados entre as amostras assim classificadas: amostras válidas (onde foi possível a extração de DNA, amplificação na metodologia RT-PCR em plataforma aberta com *kits* Life Technologies® e/ou COBAS 4800® com validação de resultados em positivos ou negativos); amostras inválidas (que com uso de um e/ou outro *kit* apresentaram resultados inválidos) e as amostras não avaliadas (conforme Tabela 32).

Não houve randomização na escolha das amostras para serem avaliadas ou não, ou mesmo controle das variáveis pré-analíticas (qualidade de Formol, tempo de formolização, laboratório proveniente, idade do bloco, entre outros). Comparando-se as populações amostras válidas, amostras inválidas e amostras não avaliadas, houve diferença significativa apenas para os parâmetros “estado na última consulta” (vivo sem doença, vivo com doença ou morte pelo melanoma), ulceração na histopatologia e porcentagem de expressão IHQ de p53. Pouco mais da metade dos eventos morte (54,5%) ocorreu entre as amostras válidas. Da mesma forma, o maior número de melanomas ulcerados (42,9%) estava entre as amostras válidas. Em relação a expressão IHQ de p53, mais da metade dos melanomas com percentual abaixo ou igual a 1% estavam entre as amostras inválidas.

Tabela 31 - Parâmetros comparados vs p-valor (Qui-quadrado ou Fisher)

Parâmetro	p-valor
idade categorizada por décadas	0,613
idade categorizada maior ou menor 50 anos	0,713
Elastose	0,672
Fototipo	0,45
Sexo	0,502
procedência	0,294
nível de instrução	0,286
sítio anatômico	0,327
lesão em área desnuda (sim ou não)	0,841
ulceração na admissão	0,08
satelitose na admissão (macrossatelitose)	0,218
metástase em trânsito na admissão	0,237
metástase linfonodal na admissão	0,832
metástase sistêmica na admissão	0,668
linfonodo sentinela positivo	0,741
linfonodo positivo no esvaziamento	0,311
recidiva (sim ou não)	0,163
estado na última consulta (vivo sem ou com doença, morto)	0,015
expressão IHQ de BRAF V600E	0,362
expressão IHQ de PTEN	0,26
expressão IHQ de p53 (0-1%; 2-10%, 11-30%,31-50%, >50%)	0,114
expressão IHQ de p53 (0-1%, >1%)	0,007
tipo histológico	0,357
índice de Breslow	0,056
Clark	0,249
infiltração linfocítica peritumoral	0,16
infiltração linfocítica intratumoral	0,707
invasão vascular	0,201
invasão perineural	0,342
fenômeno de regressão	0,62
Microsatelitose	0,697
ulceração na histopatologia	0,031
presença de lesões associadas	0,273
estadio T	0,069
estadio N	0,176
estadio M	0,169

valores de p de acordo com testes de qui-quadrado ou teste exato de Fisher

Ensaio: Válidos Vs Inválidos Vs Não Realizados

Tabela 32 - Amostras vs % de expressão IHQ de p53

	Amostras			Total	p-valor
	válido	inválido	não realizado		
0-1%	3	11	5	19	p=0,007
	15,8%	57,9%	26,3%	100,0%	
ACIMA DE 1%	36	30	5	71	
	50,7%	42,3%	7,0%	100,0%	
Total	39	41	10	90	
	43,3%	45,6%	11,1%	100,0%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 33 - Amostras vs ulceração na histopatologia

	Amostras			Total	p-valor
	válido	inválido	não realizado		
Ausente	14	27	24	65	p=0,031
	21,5%	41,6%	36,9%	100,0%	
Presente	24	14	18	56	
	42,9%	25,0%	32,1%	100,0%	
Total	38	41	42	121	
	31,4%	33,9%	34,7%	100,0%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 34 - Amostras vs estado na última consulta

	Amostras			Total	p-valor
	válido	inválido	não realizado		
Vivo sem doença	27	41	53	121	p=0,015
	22,3%	33,9%	43,8%	100,0%	
Vivo com doença	4	2	5	11	
	36,4%	18,2%	45,5%	100,0%	
Morte por melanoma	12	7	3	22	
	54,5%	31,8%	13,6%	100,0%	
Total	43	50	61	154	
	27,9%	32,5%	39,6%	100,0%	

p<0,05, teste qui-quadrado ou exato de Fisher

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Nenhuma associação significativa foi observada analisando-se o *status* da mutação de *BRAF* V600E com estes três parâmetros que foram significantes na análise das amostras válidas, inválidas e não avaliadas. Analisando-se as amostras separadamente para os mesmos três critérios, observa-se na comparação amostras válidas *versus* inválidas uma diferença significativa nos parâmetros expressão de p53 ($p=0,038$) com um maior número de casos de expressão p53 menor ou igual a 1% nas amostras inválidas (78,6% dos casos expressão até 1%) e diferença significativa também na variável ulceração ($p=0,01$) com 63,2% dos melanomas ulcerados presentes entre os testes validados (negativos e positivos).

4.9 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS VALIDADAS NA PESQUISA DA MUTAÇÃO *BRAF* V600E

Entre os 8 pacientes (8 casos de melanoma em 8 pacientes distintos) com melanoma com mutação *BRAF* V600E detectada, 7 eram do sexo feminino, 7 apresentavam fototipo I a III (50% fototipo III) e apenas 1 paciente foi classificado como fototipo IV de acordo com o proposto por FITZPATRICK (1988). Destes, 87,5% dos casos estavam localizados em membros inferiores, quatro nas pernas, dois na região plantar, um na região subungueal do pé e apenas um na face. Apenas dois casos localizavam-se em área desnuda para vestimenta de uso diário. Na admissão, um apresentava metástase linfonodal clínica, um apresentava metástase em trânsito e nenhum apresentava metástases à distância (informação presente

em sete casos). Em seis pacientes o linfonodo sentinela foi avaliado sendo em 2 casos, positivos (33,3%). No paciente com metástase linfonodal clinicamente detectada o estudo anatomopatológico após esvaziamento radical confirmou metástase linfonodal somando 37,5% de acometimento linfonodal entre os melanomas com mutação *BRAF* V600E detectada. Ao final do estudo dois casos foram a óbito pelo melanoma (25%). Nenhuma mutação *NRAS* Q61L (4 resultados válidos, dois ensaios não realizados e dois ensaios invalidados) bem como nenhuma mutação de *KIT* V559A (4 resultados válidos, dois ensaios não realizados e dois ensaios invalidados) foi detectada entre os casos *BRAF* V600E positivos.

De acordo com o anatomopatológico original (revisão antes do tratamento) entre os oito casos de melanomas mutados *BRAF* V600E (em sete havia a informação), três eram do tipo extensivo superficial, três eram do tipo acral lentiginoso e um nodular. Em um caso não havia referência ao tipo de melanoma no laudo. Todos se apresentavam em fase de crescimento vertical (todos invasivos), Clark III e IV em todos (Clark IV em 75%), Breslow variando entre 0,9 a 12mm (média 4,6mm, 50% acima de 4mm). Todos exceto dois casos apresentavam mitoses no componente invasivo. Invasão angiolinfática e perineural estavam presentes em 50% e 25% dos casos, respectivamente. Nenhum fenômeno de regressão foi descrito. Ulceração estava presente em 75% e microssatelitose em 25% dos casos. Nenhuma lesão associada (nevo) havia nos 5 casos onde havia a informação.

Entre os mutados para *BRAF* V600E a expressão IHQ de *BRAF* V600E foi negativa (não coincidente) em 3, indeterminada em 1 caso, e

positiva (coincidente) em 4 casos de melanoma (50%). A expressão IHQ de PTEN foi positiva nos 6 casos (75%), indeterminada em 1 caso e negativa em apenas 1 caso. A expressão nuclear de p53 estava presente em 6 casos (75%) e todos exceto um caso (87,5%) apresentavam até 50% de expressão IHQ de p53. Na avaliação da elastose 75% dos casos apresentavam nenhuma ou discreta elastose solar.

Entre as 35 amostras sem detecção de mutação de *BRAF*, 10 casos (28,6%) ocorreram em pacientes fototipo IV e V e 71,4% eram fototipos I a III, sendo mais da metade fototipo II. Dezesete casos eram do sexo masculino (48,5%), 74,3% tinham mais de 50 anos de idade, 37,1% dos casos eram localizados em tronco, 14,3% na cabeça e pescoço, 25,7% em pele glabra e subungueais. Pouco mais de 30% dos casos se localizava em área desnuda. Aproximadamente 14,3% destes casos apresentavam metástase linfonodal clinicamente significativa na admissão e 29,2% dos linfonodos sentinelas eram positivos entre os 25 casos nos quais foram realizados. Nenhuma metástase sistêmica foi detectada na admissão entre estes casos. Durante a evolução, um caso apresentou recidiva local, três casos apresentaram metástase em trânsito, 8,6% dos casos apresentaram recidiva na base linfonodal e em 25,7%, recidiva sistêmica.

De acordo com o anatomopatológico entre os 35 casos de melanoma não mutados para *BRAF* V600E, havia informação de tipo histológico em 31 casos, sendo 14 eram do tipo extensivo superficial (45,2%), seis (19,4%) eram do tipo acral lentiginoso e 6 (19,4%) do tipo nodular. Nível de Clark variou de I a V, sendo IV e V em 65,6% (21 de 32 casos onde havia a

informação). Havia a informação de Breslow em 29 casos e destes 44,8% eram iguais ou superiores a 4mm de espessura tumoral máxima. Invasão angiolinfática e perineural estavam presentes em 21,9% (7 de 32 casos informados) e 12,9% (4 de 31 casos informados) dos casos respectivamente. Fenômeno de regressão ocorreu em 4 de 31 casos descritos. Ulceração estava presente em 60% dos 30 casos onde havia a informação. Apenas uma lesão associada (nevo) foi descrita nos 23 casos onde havia a informação.

Nenhuma mutação de *NRAS* Q61L (18 resultados válidos, 16 ensaios não realizados e 1 ensaio invalidado) e nenhuma mutação de *KIT* V559A (10 resultados válidos, 13 ensaios não realizados e 12 ensaios invalidados) foi detectada entre os casos *BRAF* V600E negativos.

Tabela 35 - Características clínicas, demográficas e histopatológicasMelanomas com mutação *BRAF* V600EIdade (por décadas)

	Frequência	porcentagem
21-30	1	12,5
31-40	2	25,0
41-50	2	25,0
51-60	1	12,5
81-90	1	12,5
91-100	1	12,5
Total	8	100,0

Idade (menor ou igual a 50 anos e maior de 50 anos)

	Frequência	porcentagem
Até 50 anos	5	62,5
Mais de 50 anos	3	37,5
Total	8	100,0

Elastose (de acordo com LANDI e colaboradores)

	Frequência	porcentagem
0	5	62,5
0+	1	12,5
2+	1	12,5
3,00	1	12,5
Total	8	100,0

Fototipo

	Frequência	porcentagem
Fototipo I	1	12,5
Fototipo II	2	25,0
Fototipo III	4	50,0
Fototipo IV	1	12,5
Total	8	100,0

sexo

	Frequência	porcentagem
Masculino	1	12,5
Feminino	7	87,5
Total	8	100,0

Cont/ Tabela 35

Melanomas com mutação <i>BRAF</i> V600E		
Sítio anatômico		
	Frequência	Porcentagem
Face e pescoço	1	12,5
Membros	7	87,5
Total	8	100,0
Melanoma em área desnuda		
	Frequência	porcentagem
Não	6	75,0
Sim	2	25,0
Total	8	100,0
Ulceração clinicamente evidente na admissão		
	Frequência	porcentagem
Sim	3	100,0
Não informado	4	
Total	7	
Satelitose clínica na admissão		
	Frequência	porcentagem
Não	7	100,0
Sem informação	1	
Metástase em trânsito na admissão		
	Frequência	porcentagem
Não	6	85,7
Sim	1	14,3
Total	7	100,0
Metástase linfonodal na admissão		
	Frequência	porcentagem
Não	6	85,7
Sim	1	14,3
Total	7	100,0
Metástase sistêmica na admissão		
	Frequência	porcentagem
Não	7	100,0
Sem informação	1	

Cont/ Tabela 35

<u>Melanomas com mutação <i>BRAF</i> V600E</u>		
<u>Mutação <i>NRAS</i> Q61L</u>		
	Frequência	porcentagem
Negativo	4	50,0
Inválido	2	25,0
Não avaliado	2	25,0
Total	8	100,0
<u>Mutação <i>KIT</i> V559A</u>		
	Frequência	porcentagem
Negativo	4	50,0
Inválido	2	25,0
Não avaliado	2	25,0
Total	8	100,0
<u>Expressão IHQ de <i>BRAF</i> V600E (intensidade)</u>		
	Frequência	porcentagem
Negativo	3	42,9
Positivo fraco	2	28,5
Positivo moderado	1	14,3
Positivo forte	1	14,3
Total	7	100,0
<u>Expressão IHQ de <i>BRAF</i> V600E (intensidade)</u>		
	Frequência	porcentagem
Negativo	3	42,9
Positivo	4	57,1
Total	7	100,0
<u>Expressão IHQ de <i>PTEN</i></u>		
	Frequência	porcentagem
Negativo	1	14,3
Positivo	6	85,7
Total	7	100,0
<u>Porcentagem de expressão IHQ de p53</u>		
	Frequência	porcentagem
0-1%	2	25,0
Acima de 1%	6	75,0
Total	8	100,0

Cont/ Tabela 35

Melanomas com mutação <i>BRAF</i> V600E		
Tipo histológico		
	Frequência	porcentagem
Acral/Acral Lentiginoso	3	37,5
E.Superficial	3	37,5
Nodular	1	12,5
Não Classificável	1	12,5
Total	8	100,0
Clark		
	Frequência	porcentagem
III	2	25,0
IV	6	75,0
Total	8	100,0
Breslow(mm)		
	Frequência	porcentagem
Até 1	1	12,5
Entre 1-2	1	12,5
Entre 2-3	2	25,0
Mais de 4	4	50,0
Total	8	100,0
Invasão vascular		
	Frequência	porcentagem
Ausente	4	50,0
Presente	4	50,0
Total	8	100,0
Invasão perineural		
	Frequência	porcentagem
Ausente	6	75,0
Presente	2	25,0
Total	8	100,0
Fenômeno de regressão		
	Frequência	porcentagem
Ausente	6	75,0
Presente	2	25,0
Total	8	100,0
Ulceração (histopatológico)		
	Frequência	porcentagem
Ausente	2	25,0
Presente	6	75,0
Total	8	100,0

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

4.10 AVALIAÇÃO DA CASUÍSTICA CONSIDERANDO APENAS OS MELANOMAS INVASIVOS

Foram cento e trinta e sete casos de melanomas cutâneos primários invasivos o que corresponde a 87,7% de toda a amostra.

A idade variou de 17 a 96 anos com média de 55,3 anos e mediana de 56,5 anos. O sexo feminino predominou com 65% dos casos e 67% dos pacientes tinham apenas até o primeiro grau completo. O fototipo II correspondeu a 38,2% dos casos, mas 27,9% dos casos eram fototipo IV e V. O sítio anatômico mais acometido foi o tronco em 36,5% dos casos seguido de membros em 32,1%, pele glabra (subungueal, palma e palma) em 19,7% e cabeça e pescoço em 11,7%, sendo que áreas desnudas estavam acometidas em 31,4%. Nos casos em que a informação estava presente (ausência de biópsia excisional prévia e relato no prontuário) na primeira consulta, ulceração clinicamente evidente ocorreu em 75,8% dos casos, macrossatelite em 6,3%, metástases em trânsito em 3,8%, metástase linfonodal clínica em 14,2% e metástases sistêmicas em 1,5%.

A pesquisa de linfonodo sentinela foi realizada em 68,1% dos casos e esvaziamento radical da base linfonodal foi realizada de princípio em 12,6% dos casos (alguns que apresentavam doença metastática sistêmica não foram submetidos a esvaziamento linfonodal). A taxa de linfonodos sentinelas positivos entre os que foram submetidos a pesquisa intraoperatória foi de 28,3% e o esvaziamento complementar da base linfonodal revelou presença de linfonodos não-sentinela positivos em 24%

dos casos. Radioterapia adjuvante foi incluída no tratamento em 14,3% e nenhum paciente foi submetido a quimioterapia adjuvante. Apenas 2,3% dos casos recebeu interferon adjuvante. Recidivas, local, metástase em trânsito, linfonodal e sistêmica ocorreram em 1,5%, 5,9%, 4,4% e 16,3% respectivamente.

O subtipo histológico extensivo superficial predominou com 52,5% dos casos, nodular em 17,2% e acral em 15,6%. Clark IV e V corresponderam a 56,2% dos casos e o Breslow variou de 0,1mm a 90mm (mais de 4mm em 33,1% dos casos) com média de 5,6mm e mediana de 2,2mm. Invasão vascular e perineural estavam presentes em 19% e 10,4% respectivamente. Ulceração estava presente em 50% dos casos e microssateliteose em 9,7%.

Do ponto de vista biomolecular, a mutação *BRAF* V600E foi detectada em apenas oito casos o que correspondeu a 19,5% dos ensaios válidos (29,9% de ensaios válidos, inválidos 31,4% e não realizado em 38,7%). Nenhuma mutação *NRAS* Q61L foi detectada (negativos em 82% e inválidos em 18%) e nenhuma mutação *KIT* V559A foi detectada (66% das amostras foram inválidas). A expressão IHQ da proteína mutada *BRAF* V600E foi negativa em 66,3% dos casos, mas positiva moderada a forte intensidade em apenas 10,4% dos casos. Apenas 15,9% dos casos não expressaram *PTEN* que foi positivo forte em 65,9% dos casos. Imunoexpressão de p53 acima de 10% da área tumoral aconteceu em 59,5% dos casos e estava presente (acima de 1%) em 78,6% dos casos.

A idade (categorizada e décadas) teve associação inversa significativa com nível de instrução ($p=0,009$), com o *status BRAF V600E* ($p=0,027$) e imunexpressão de *BRAF V600E* ($p=0,016$). Metástases em trânsito ocorreram mais frequentemente entre a 5ª e 7ª décadas ($p=0,044$). Linfonodo sentinela positivo ocorreu mais frequentemente entre homens (43% vs 20,9%; $p=0,026$). Entre as mulheres, o sítio anatômico membros foi acometido em 40,4% enquanto nos homens em 16,7% e o sítio cabeça e pescoço estava acometido entre as mulheres em 9% e entre homens em 16,7% ($p=0,007$). O fototipo teve associação com o *status BRAF V600E* ($p=0,039$) com 87,5% dos casos mutados entre fototipos I a III e nenhum caso mutado entre fototipos V. Da mesma forma, entre os casos que não expressavam p53 (p53 até 1%) 44,4% eram fototipos I a III ($p=0,013$). Nenhum sítio tronco apresentou mutação *BRAF V600E* e considerando os sítios anatômicos tronco vs não tronco, houve associação significativa com esta mutação ($p=0,045$). Nenhuma associação significativa foi observada entre a mutação *BRAF V600E* com a expressão IHQ de PTEN. A expressão IHQ de p53 acima de 10% da área tumoral estava presente em 88,8% dos casos no sítio cabeça e pescoço, 70% no sítio tronco e 38,8% entre os subungueais, palmares e plantares ($p=0,038$) e a recidiva ocorreu em 38,2% dos casos com expressão IHQ de p53 até 10% contra 18% dos que apresentavam expressão IHQ acima de 10% da área tumoral ($p=0,038$).

A expressão IHQ de p53 (considerando o parâmetro até 1% negativo e acima de 1%) teve associação inversa com a ocorrência de recidiva ($p=0,017$), recidiva sistêmica ($p=0,017$) e invasão perineural ($p=0,044$) sendo

que 75% dos casos com mutação *BRAF* V600E expressavam p53 acima de 1% ($p=0,043$).

A sobrevida global média foi de 134 meses e a sobrevida global mediana não foi atingida. Na análise univariada, os fatores com significativo impacto foram: ocorrência de recidiva ($p<0,001$), metástases em trânsito na admissão ($p<0,001$), metástase linfonodal clínica na admissão ($p<0,001$), linfonodo sentinela positivo ($p=0,007$), subtipo histológico ($p=0,013$), nível de Clark ($p=0,003$), índice de Breslow ($p<0,001$), ulceração na histologia ($p=0,003$) e expressão IHQ de p53 categorizado como até 1% da área tumoral ou acima de 1% ($p=0,006$).

A sobrevida livre de recorrência média foi de 124 meses e a mediana não foi atingida. Na análise univariada, os fatores com significativo impacto foram: macrossatelitose na admissão ($p<0,001$), metástases em trânsito na admissão ($p<0,001$), metástase linfonodal clínica na admissão ($p<0,001$), linfonodo sentinela positivo ($p=0,002$), subtipo histológico ($p=0,008$), nível de Clark ($p<0,001$), índice de Breslow ($p<0,001$), ulceração na histologia ($p<0,001$), expressão IHQ de p53 categorizado como até 10% da área tumoral ou acima de 10% ($p=0,038$) e expressão IHQ de p53 categorizado como até 1% da área tumoral ou acima de 1% ($p=0,001$).

A imunexpressão de p53 (categorizado como até 1% da área tumoral ou acima de 1%) manteve-se como fator significativo ($p=0,006$) na análise multivariada quando considerado os fatores subtipo histológico, nível de Clark, espessura de Breslow e ulceração na histopatologia para a sobrevida livre de recorrência, mas não para a sobrevida global.

5 DISCUSSÃO

Na presente tese, foi demonstrado na população estudada de pacientes portadores de melanomas cutâneos tratados no hospital Haroldo Juaçaba, em comparação com as coortes de melanomas cutâneos entre caucasianos, uma maior heterogeneidade de fototipos e elevada prevalência de elastose solar (possivelmente relacionada a padrão de exposição solar não intermitente). Adicionalmente, a prevalência da mutação *BRAF* V600E foi baixa quando comparada com a da população caucasiana, mas semelhante a de algumas populações não caucasianas. Da mesma forma, comparando-se à literatura, demonstrou-se diferenças clínico-patológicas no padrão de melanomas mutados *BRAF* V600E, infrequente perda da expressão IHQ de PTEN e frequente expressão IHQ de p53, este ainda com impacto protetor na sobrevida.

Historicamente a avaliação de fototipo tem sido determinada por investigadores e clínicos de acordo com a avaliação de eritema induzido por UVR bem como a capacidade de bronzeamento. Classicamente a metodologia de FITZPATRICK (1988) tem sido utilizada e comparada a outras metodologias. Caracterizada e criticada pela subjetividade na avaliação, especialmente por se tratar de uma avaliação pessoal do indivíduo quanto à sua capacidade de bronzeamento e ao mesmo tempo da sua susceptibilidade à queimaduras solares, é ainda uma metodologia barata, simples, aplicada durante a anamnese e que avalia as duas

condições da cor da pele, a constitutiva e a facultativa, em áreas expostas ao sol e portanto apreciando a dinâmica da melanogênese individual em resposta exposição solar.

A busca por um método mais objetivo de avaliação de fototipo com a avaliação apenas da cor da pele constitucional levou PERSHING et al. (2008) a desenvolver um método com uso do espectrofotômetro de reflectância e aferição na área volar do braço, após a busca e comparação de diversas áreas de expostas e não expostas ao sol. Embora tenha descrito que a cor constitutiva da pele sofre pouca variação sazonal, há que se preocupar de como seria essa variação mesmo na área sugerida para avaliação por espectrofotometria de reflectância em países e regiões em que quase nenhuma diferença existe na irradiação solar durante as estações do ano, como no nordeste brasileiro. Além disso o efeito sazonal na estimativa de densidade de melanina por reflectância da pele medida por espectrofotometria na face interna superior do braço (área classicamente utilizada para avaliação da cor constitutiva da pele) foi confirmada, como apresentando diferença significativa entre o verão e o inverno (VAN DER MEI et al. 2002). Portanto, para esta metodologia, uma validação da estimativa de densidade de melanina deveria ser realizada também em regiões onde a média de UVR é constantemente elevada como no nordeste brasileiro.

Embora haja uma busca por uma avaliação quantitativa, mais objetiva e mais precisa do fototipo da pele, utilizando-se instrumentação tecnologicamente avançada e até modelos matemáticos vetoriais, deve-se

considerar que a cor da pele é dada por pigmentação constitutiva e pigmentação facultativa ou induzida. Desta forma a dificuldade de avaliação da própria pigmentação constitutiva aconteceria em áreas geográficas como o Nordeste brasileiro onde mesmo áreas corporais como superfície medial do braço poderiam sofrer com a ação da UVR, caracteristicamente constante e elevada, demonstrando muito mais uma mistura de cor constitutiva e cor facultativa do que propriamente apenas a cor constitutiva pura, levando assim a erros de classificação. Além do mais, mesmo em modelos vetoriais como o modelo de ângulo tipológico individual proposto por CHARDON (1991), as categorias de pele são definidas não por números bem definidos, mas por faixas de ângulos adjacentes.

Desta forma, mesmo com a dificuldade inerente à constante e elevada irradiação solar, a classificação de Fitzpatrick não perde o seu valor, uma vez que na descrição da resposta individual da pele a UVR, pode-se avaliar o fototipo, obviamente aceitando que alguma superposição de grupos poderá haver, especialmente nos grupos I e II e nos grupos III e IV.

Como um país onde quase todo território situa-se na zona tropical e subtropical, a média de UV_i é muito elevada em todo território brasileiro. Embora nas regiões Sul e Sudeste do Brasil ainda haja uma variação sazonal de UV_i , o norte-nordeste brasileiro segundo CORRÊA (2015) se caracteriza por uma constante e elevada UV_i ficando claro que o padrão de irradiação solar diverge em muito do padrão de exposição europeu e norte americano. Importante considerar que a elevada intensidade de UVR já acontece no nordeste antes da 9 horas da manhã e não próximo ao meio

dia. Portanto, durante quase toda a jornada de trabalho o nordestino está exposto a níveis elevados de UVR, sobretudo os trabalhadores externos (*outdoors*). Há uma provável variabilidade de alterações no DNA causadas pela UVR para as diversas regiões do globo, podendo até variar de acordo com a latitude como ficou sugerido no trabalho de SCHUCH et al. (2012) quando demonstraram quantidades diferentes de diferentes fotoprodutos de DNA criados a partir da interação do DNA com UVB, confirmando a impressão de muitos epidemiologistas que atribuem a variação de incidência do melanoma cutâneo não só às características dos hospedeiros, mas também à intensidade de radiação ultravioleta nas diferentes latitudes geográficas (LENS e DAWES 2004). Na mesma direção OSSIO et al. (2017) destacam o melanoma cutâneo como o exemplo de neoplasia maligna com diferenças marcantes na apresentação, incidência e mortalidade quando estratificado por países, etnia e status socioeconômico.

É fácil entender portanto que variações raciais, de fototipo de pele e de exposição solar podem influenciar os mecanismos moleculares de melanogênese de uma determinada população.

O Brasil é um país de dimensões continentais com vasto território entre a linha do Equador e o trópico de Capricórnio. O nordeste brasileiro, especialmente a faixa litorânea dos estados mais setentrionais como o Ceará, encontra-se próximo à linha do Equador sendo uma das regiões de maior índice de exposição solar do país.

Caracterizada por grande miscigenação de raças e pluralidade de fototipos de pele, a população brasileira difere muito das populações

estudadas em coortes da maioria dos estudos de perfil de mutações no melanoma. E ainda, por ser um país predominantemente tropical, esta população sofre intensa exposição solar, notadamente na região Nordeste sem a intermitência sazonal, também característica da maioria das coortes estudadas. O estudo de MENDES et al. (2010) enfatiza que a descendência europeia no Nordeste é quase que na sua totalidade formada por ibéricos, especialmente portugueses. Justifica a maior mortalidade para melanoma nas regiões Sul e Sudeste pelo predomínio da ascendência europeia branca bem como pela maior concentração de descendentes da Europa central e leste europeu que apresentam cor da pele mais clara quando comparados a ibéricos. No entanto, os números dos registros de óbitos no Brasil podem esconder uma subnotificação de mortes por melanoma nas regiões menos desenvolvidas como no nordeste brasileiro, fato registrado pelo autor do trabalho como um dos fatores limitantes na análise dos resultados.

PENA et al. (2011) deixam claro num estudo genômico brasileiro que a informação por autodeclaração da cor da pele (utilizado pelo IBGE) é inadequado como referencial de etnia ou ascendência, uma vez que indivíduos autodeclarados pardos na região Norte tinham em média 68,6% de ancestralidade europeia, enquanto na região Sul tinham em média 44,4% de ascendência africana.

Deve-se considerar que a maciça maioria dos trabalhos realizados, tanto clínicos quanto genômicos, não contemplam as populações não europeias ou de descendência europeia como enfatizaram SCHMERLING et al. (2011) bem como OSSIO et al. (2017). Estes últimos ainda afirmaram que

o foco do estudo do melanoma deveria ser nas diferenças culturais e ancestrais nos diversos países e não nas similaridades. De acordo com VAZQUEZ et al. (2015), no ano 2001 o melanoma cutâneo foi o primeiro tumor maligno a ser estadiado utilizando-se um sistema baseado em evidência, com uma base de dados de mais de 17.000 casos, nenhum deles provenientes da América Latina e tampouco do Brasil. Outra comprovação da deficiência de estudos de nossa população é uma metanálise de estudos de prevalência em melanomas primários de mutação dos genes *BRAF* e *NRAS* (LEE et al. 2011) que incluiu 36 estudos de *BRAF* e 31 estudos de *NRAS*, nenhum deles em populações latinoamericanas. No projeto “*The Cancer Genome Atlas Network*” a etnia caucasiana representava 96% dos casos, havendo em toda coorte de 333 melanomas em 331 pacientes apenas 4 latinos, 1 negro e 6 asiáticos (Cancer Genome Atlas Network 2015).

As frequências de mutações e a relação com alguns parâmetros histopatológicos na Europa e EUA demonstram a biologia do melanoma cutâneo para uma população caucasiana e com claro padrão de exposição solar intermitente. No caso de coortes de estudos australianos, embora padrão de exposição solar mais parecido com o da população brasileira (especialmente da região Sudeste), também predomina de modo quase homogêneo a raça branca e os fototipos baixos. Além disso, é pobre a literatura médica no que diz respeito ao estudo das mutações *BRAF*, *NRAS* e *KIT* e suas possíveis relações com fototipos da pele.

A população estudada de casos de melanoma cutâneos tratados no Hospital Haroldo Juaçaba representa bem a população proveniente do Estado do Ceará, visto que pelo menos 49 municípios foram representados. Ainda há que se considerar que na maioria das vezes é Fortaleza o município apontado como procedência, muitas vezes no intuito de facilitar o acesso ao tratamento pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Segundo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar o perfil molecular do melanoma cutâneo numa população do Nordeste brasileiro.

Durante o projeto deste estudo já se ressaltava a importância da determinação do perfil biomolecular dos melanomas cutâneos atendidos no Hospital Haroldo Juaçaba, sobretudo a pesquisa da prevalência da mutação de *BRAF* como instrumento farmacoeconômico para a previsão de tratamento por terapia alvo em pacientes que apresentarão doença metastática, dada a elevada frequência de doença avançada já na consulta inicial. De fato durante este estudo, trabalhos consolidaram ainda mais os novos tratamentos por terapia alvo da doença metastática e o recente trabalho de LONG et al. (2017) começa a apontar para a importância do reconhecimento biomolecular da mutação *BRAF* V600E do melanoma cutâneo também no cenário adjuvante.

Não diferente dos dados da literatura mundial, na população estudada os homens apresentavam diagnósticos mais tardios (estádios avançados) quando comparados às mulheres (embora sem diferença estatística) considerando ulceração, Breslow, linfonodos clinicamente positivos e linfonodos sentinelas positivos. Possivelmente fato explicado em parte pela

observação de BLUM et al. (2007) que embora a maioria dos pacientes detectem por si a doença (autoexame), os homens com mais frequência são alertados por terceiros.

Na nossa casuística um dado que chamou a atenção foi não haver diferença significativa quando comparamos fatores prognósticos reconhecidos do melanoma primário como espessura de Breslow e ulceração por nível de instrução do paciente. A falta de uma esperada diferença entre os níveis de instrução do paciente e a precocidade do diagnóstico está de acordo com a observação de BLUM et al. (2007) na qual 26% dos pacientes brasileiros no seu estudo simplesmente desconheciam a importância do diagnóstico precoce para a cura. O desconhecimento sobre a importância do diagnóstico é ainda mais preocupante quando observamos que os dados do trabalho de BLUM et al. (2007) provém de uma pequena série de pacientes brasileiros com uma média de espessura de Breslow de apenas 0,5mm, bem inferior à média de nossa população estudada, atendidos num centro de referência de tratamento oncológico (A.C.Camargo Cancer Center em São Paulo-SP) e numa cidade com um elevado índice de desenvolvimento humano, bem superior a maioria das regiões menos favorecidas do país e onde há grande densidade de médicos especialistas. Infelizmente não foi informado o nível socioeconômico da população estudada no trabalho de BLUM et al. (2007), mas muito provavelmente estes dados não refletem a nossa realidade no nordeste brasileiro e no Ceará.

O tipo de exposição solar também pode levar a alterações histopatológicas adjacentes ao melanoma primário, notadamente a elastose

solar. Embora por alguns considerada marcador de dano solar crônico ou cumulativo, por outros como uma medida de tolerância à exposição solar (BAUER et al. 2011) e até como ser um marcador de acúmulo de exposição solar independente da periodicidade (KVASKOFF et al. 2015), é reconhecido na literatura mundial que a elastose solar acontece muito mais frequentemente em idosos e na região da cabeça e pescoço. Um dos maiores estudos de elastose solar e melanoma utilizou-se do material de um estudo multi-institucional – estudo GEM (*Genes, Environment and Melanoma*; BEGG et al. 2006) retirados de indivíduos provenientes da Austrália, Canadá, Itália e EUA. Neste estudo, 88% das amostras eram provenientes de pele clara ou muito clara e ficou evidente que o dano solar teve os mais elevados escores nas amostras australianas, refletindo que embora populações semelhantes (europeus e descendência europeia), o tipo de irradiação solar sofrida pelos australianos é diferente das demais populações estudadas. Possivelmente o elevado percentual de peles muito claras tenha limitado a capacidade do estudo em demonstrar a associação entre a habilidade de bronzeamento e a elastose solar.

A Austrália tem seu território praticamente dividido ao meio pela linha do Trópico de Capricórnio e se encontra quase todo entre os paralelos sul 20 e 40 enquanto que o nordeste brasileiro quase todo situa-se acima do paralelo sul 15, o Ceará quase todo acima do paralelo sul 5. Entre as populações caucasianas mais estudadas, é a população australiana que está submetida a UVR que mais se assemelha à população brasileira.

A população do nordeste brasileiro apresenta um grau de miscigenação entre descendentes de europeus, indígenas e africanos bem diferente da população australiana. Na nossa casuística, elastose foi observada em quase 70% dos casos e em quase um terço dos casos a elastose era de moderada a severa. A elastose, a exemplo da literatura, teve associação significativa com a idade mais avançada, o sítio anatômico face e pescoço (50% destes apresentavam elastose maior ou igual a 2+ de acordo com os critérios de LANDI et al. (2006) e tumor primário em área desnuda.

Embora sem nenhum dado de fototipo e características fenotípicas (fato lamentado em seu estudo pelos autores), BAUER et al. (2011) considerando semelhantes as populações estudadas norteamericana e australiana, exceto no tipo de exposição solar, atribuem uma menor prevalência de mutação de *BRAF* da população australiana (39%) quando comparada a norteamericana (50,5%) ao aumento da elastose solar concluindo haver uma diminuição progressiva da prevalência desta mutação à medida que aumentava o índice de elastose solar em ambas coortes. Na nossa casuística, embora não tenha sido atingida a significância estatística, muito provavelmente pelo baixo número de casos com detecção da mutação *BRAF V600E*, 75% dos casos *BRAF V600E* apresentavam ausência de elastose ou elastose insignificante (critérios 0 e 0+ de LANDI et al. 2006) coincidindo com dados da literatura. No trabalho utilizando amostras de brasileiros (ESTROZI et al. 2014), por terem os autores concentrado seu estudo em pacientes jovens, a elastose solar não pôde ser verdadeiramente

avaliada uma vez que está diretamente associada a idades mais avançadas. Os autores referem que em alguns casos nenhuma informação clínica pôde ser extraída e não há referência a procedência dos pacientes. Considerando que a etnia e o fototipo dos pacientes no sul e sudeste do país (onde se encontravam os laboratórios de patologia envolvidos no estudo) costumam ser diferentes do observado no nordeste, aqueles com maior prevalência de caucasianos (até mesmo não ibéricos) e com fototipos de pele baixos, não foi possível uma comparação com nossos dados.

Poucos estudos procuraram demonstrar associação entre o fototipo de pele e a presença de mutação *BRAF* V600E. Na nossa estatística, o pequeno número de casos possivelmente impediu a observação de diferenças significativas entre fototipos e a presença da mutação *BRAF* V600E. Todos os pacientes portadores de melanomas mutados *BRAF* V600E, exceto um, eram fototipo de I a III, sendo 50% do fototipo III, Também no estudo de uma pequena série de pacientes italianos (VENESIO et al. 2008) não houve diferenças entre o fototipo de pele e presença de mutação no gene *BRAF*, mas todos os pacientes tinham fototipo I a III, metade deles correspondente ao fototipo III.

As características clínico-patológicas de nosso estudo se assemelham com o estudo de VAZQUEZ et al. (2015) que incluíram 1073 portadores de melanomas cutâneos. No entanto, embora neste estudo a localização em tronco tenha sido prevalente entre os homens e os membros inferiores entre as mulheres, no presente estudo a localização tronco ainda foi a mais prevalente, mesmo entre as mulheres. Todavia houve diferença

estatisticamente significativa entre os sítios anatômicos comparados por sexo. Infelizmente a grande casuística do estudo de VAZQUEZ et al. (2015) foi dividida apenas em duas categorias, brancos e não-brancos por auto-declaração, não havia nenhuma informação biomolecular e apenas aproximadamente 10% dos pacientes eram provenientes do Nordeste, impedindo maiores comparações com a população por nós avaliada.

Comparando a nossa casuística com uma série brasileira de pacientes portadores de melanomas cutâneos primários submetidos a pesquisa de linfonodo sentinela tratados no A.C.Camargo Cancer Center (BERTOLLI et al. 2015) verifica-se diferenças demográficas, clínicas e anatomopatológicas significativas. Naquela casuística as mulheres representaram 51% dos casos e o sítio anatômico cabeça e pescoço estava acometido em menos da metade da frequência comparado a nossa casuística. O subtipo extensivo superficial representou naquela casuística mais de 62% dos casos enquanto o tipo acral ocorreu em apenas 10%, diferentes dos 45,7% e 14% respectivamente, no presente estudo. Naquele trabalho a média e mediana de Breslow foi 2,4mm e 1,4mm respectivamente, enquanto que a média e mediana de Breslow em nossa casuística foi de 5,6mm e 2,2mm. Uma outra diferença anatomopatológica significativa entre estas duas casuísticas foi a ulceração, presente na casuística do A. C. Camargo Center em pouco mais de 28% entre os avaliáveis e na nossa casuística em mais de 46% dos casos avaliáveis 50% dos casos quando se considera apenas os melanomas invasivos). Estes dados poderiam justificar o achado de positividade de linfonodo sentinela

naquela casuística de pouco mais de 21% contra pouco mais de 28% no nosso trabalho, muito embora as duas casuísticas concordem na associação estatisticamente significativa do comprometimento do linfonodo sentinela com o nível de Clark, índice de Breslow e invasão perineural. Ou

Na nossa casuística a metodologia escolhida para avaliação da mutação *BRAF* V600E foi a RT-PCR em plataforma aberta utilizando-se os *kits* da Life Technologies® (possibilidade de teste para mutação de *NRAS* e *KIT*) bem como pela mesma tecnologia utilizando-se plataforma fechada Cobas® 4800. As duas plataformas foram utilizadas em várias amostras não tendo havido resultados conflitantes, muito embora dois resultados indeterminados na plataforma aberta tenham sido considerados positivos na plataforma Cobas® 4800. A grande quantidade de informação sem tradução clínica e o elevado custo do sequenciamento tipo “*next generation*” faz tornar razoável na prática clínica a aplicação de testes de pesquisa de mutações nos genes *BRAF*, *NRAS* e *KIT* de acordo com WILSON e NATHANSON (2012). A pesquisa de mutações alternativas pelo sequenciamento tipo “*next generation*” (mesmo diante da progressiva diminuição de custo) não se aplica em nosso meio, onde ainda há grande carência das clássicas drogas tipo inibidores de tirosina-quinase específicas indicadas para cada uma destas mutações clássicas.

Algumas críticas são reconhecidas para o teste de mutação *BRAF* V600E cobas® 4800, um ensaio de RT-PCR e que a exemplo de outros testes de detecção de mutação somática dependem da quantidade da sequência mutada (a ser detectada) bem como da integridade do DNA. Além

disso de acordo com WILSON e NATHANSON (2012) pode haver 66% de sensibilidade cruzada para mutação V600K e o teste não detecta mutações de dois pares de bases que resultem em mutação V600E. Muitos melanomas *in situ* foram considerados para nossa pesquisa, considerando que embora sem aplicação clínica a detecção de mutações de melanoma sem componente invasor, a inclusão destes casos poderia trazer uma informação relevante na avaliação de prevalência da mutação do gene *BRAF*, considerado um evento não só precoce, mas também mantido durante a progressão da doença de acordo com VENESIO et al. (2008). Embora apresentem dados contrários, a metanálise realizada por LEE et al. (2011) deixa claro a heterogeneidade entre os estudos na avaliação de vários aspectos clínicos, patológicos e moleculares ao ponto que embora houvesse diferenças entre a frequência de mutação no *BRAF* em relação aos índices de espessura de Breslow, tais diferenças não se repetiam com o estadiamento T (tumor primário) nos estudos analisados, fato estranho quando se considera que à época do trabalho, o estadiamento TNM empregado considerava o Breslow para a variação de T. No nosso trabalho, entre os melanomas Clark I (*in situ*), 80% dos casos testados para a mutação *BRAF* V600E tiveram ensaio invalidado, possivelmente pela dificuldade de obtenção de material para extração de DNA. Da mesma forma, a expressão IHQ de *BRAF* V600E aconteceu apenas em 11% dos casos avaliados.

Num estudo de base populacional multicêntrico (THOMAS et al. 2015) os autores incluíram diversos casos de melanomas cutâneos dos EUA,

Canadá, Austrália e Itália e deixam claro que a avaliação da prevalência da mutação de *BRAF* e *NRAS* havia sido realizada em apenas 59% das amostras e ainda assim, somente naquelas provenientes dos EUA e Austrália. Para validar os achados de 17% de mutação de *NRAS* e 30% de *BRAF*, os autores compararam as possíveis diferenças entre os grupos: testes mutacionais realizados (912 casos), tumores não avaliáveis (560 casos), insuficientes (43 casos) e que falharam na análise molecular (32 casos) não encontrando diferenças entre idade média, sexo, média de Breslow e morte para melanoma.

Na nossa casuística, considerando a detecção da mutação da mutação *BRAF* V600E, também comparamos as amostras validadas, as amostras invalidadas e as amostras não realizadas por 36 variáveis demográficas, clínicas, anatomopatológicas e imunoistoquímicas. Em apenas 3 delas houve diferença estatisticamente significativa: ulceração na avaliação histopatológica, expressão IHC de p53 e o estado na última consulta. A presença de ulceração, por alguns descritos como característica dos melanomas mutados *BRAF* V600E (SI et al. 2012; ESTROZI et al. 2014; HUGDAHL et al. 2016) predominou entre os ensaios válidos o que poderia trazer um viés de aumento na prevalência desta mutação na nossa casuística. Interessante que nenhum destes parâmetros teve associação propriamente com o *status* da mutação *BRAF* V600E.

O tratamento do melanoma metastático com inibidores de *BRAF* baseia-se fundamentalmente na detecção da mutação *BRAF* V600E no melanoma primário ou na metástase. De fato, a concordância da mutação

entre tumores primários e metastáticos autoriza o tratamento com os inibidores de TK. No entanto, há que se destacar que dentro de um cenário adjuvante, o oncologista tem acesso apenas ao melanoma primário ou no máximo a metástase linfonodal. Desta forma, todo o cuidado com o processamento do tumor primário (melanoma cutâneo) é necessário para que as propriedades do DNA nos blocos de parafina sejam mantidas, possibilitando a detecção da mutação de *BRAF*. Recentemente um estudo randomizado de fase 3 (LONG et al. 2017) comparou pacientes com melanomas cutâneos estadio clínico III portadores de mutação de *BRAF* (91% mutação V600E) para o uso de terapia adjuvante com inibidor de *BRAF* Dabrafenib e inibidor de MEK, Trametinib. O material utilizado para detecção de mutação foi obtido do melanoma primário ou da metástase linfonodal e os resultados demonstraram maior sobrevida livre de recorrência entre os pacientes tratados, embora não tenha havido um aumento da sobrevida global estatisticamente significativo.

O nosso estudo demonstrou um elevado número de amostras inviáveis para a detecção da mutação de *BRAF* V600E, mesmo entre amostras recentemente embrocadas em parafina. Melanomas cutâneos usualmente são encaminhados para os centros terciários após prévia biópsia excisional já embrocados em blocos de parafina. Quase sempre a biópsia excisional é praticada para o diagnóstico e microestadiamento do tumor primário. Portanto raramente há tumor viável no produto de ampliação das margens (tratamento do sítio primário) suficiente para um estudo genético de detecção de mutação. Frequentemente, entre os pacientes com lesão

previamente excisada, o único material disponível para detecção da mutação de *BRAF* é o bloco de parafina encaminhado para revisão de exame anatomopatológico. Muitas vezes o material é imerso em formaldeído não tamponado por longo período até que seja processado, destruindo as propriedades do DNA e inviabilizando a detecção da mutação. No nosso estudo as amostras foram provenientes de 27 laboratórios de análise patológica além do próprio laboratório de patologia do ICC. Portanto não houve como controlar a qualidade e tempo de formolização nem a qualidade de confecção e armazenamento dos blocos de parafina. Num cenário de terapia adjuvante, o paciente com melanoma cutâneo avançado poderá não ter a chance da adjuvância com inibidores de *BRAF* V600 caso não seja possível o estudo da mutação no único material presente, o bloco do tumor primário. Os laboratórios de análises histopatológicas deverão rever o tratamento dispensado às peças cirúrgicas com relação a qualidade e tempo de formolização pelo risco de degradação do DNA e privação da oportunidade de estudo genético do melanoma cutâneo primário, sobretudo nos casos em que a biópsia da metástase é inviável ou no cenário adjuvante, cada vez mais próximo da prática clínica.

É fato que existe grande variação de prevalência das mutações de *BRAF*, *NRAS* e *KIT* quando populações de outras etnias (não caucasianos) e mesmo entre caucasianos provenientes dos diversos países. Na tabela abaixo um resumo do perfil biomolecular encontrado na literatura demonstra a variabilidade de prevalência, possivelmente também associado a metodologias de detecção diferentes. Mesmo dentro de um mesmo país,

pode haver grandes diferenças de prevalências das diversas mutações como demonstrado na China e México. Também é prevista grande variação de prevalência das mutações aqui estudadas dentro do Brasil, um país de dimensões continentais com características variáveis nas diversas regiões quanto a irradiação solar, a formação étnica da população e aos fototipos de pele.

Fica claro na tabela apresentada que a menor prevalência da mutação *BRAF* V600E aconteceu na nossa casuística, excetuando-se a coorte chinesa de etnia Han estudada por Qi et al. (2011).

Tabela 36 - Comparação de Prevalência de Mutações

Autor, ano	POPULAÇÃO	SÍTIO	Mutações Estudadas			
			<i>BRAF</i> V600E	<i>NRAS</i>	<i>KIT</i>	<i>p53/</i> <i>PTEN</i>
QI et al. 2011	chineses (Han)		15%			
SI et al. 2012	chineses		25,5%	7,2%	10%	
ESTROZI et al. 2014	brasileiros	Tronco/MMII	38,7%			
FAJARDO- RAMIREZ et al. 2014	mexicanos	MMII/tronco	73%			
MASSAD et al. 2014	libaneses paquistaneses	Tronco/MMII	27,3%			
Cancer Genome Atlas Network 2015	caucasianos	Extrem/tronco	52%	28%		14,7% / 12%
SAKAIZAWA et al. 2015	japoneses	escalpo	30,4%,	12,9%	12,9%	
SIROY et al. 2015	americanos		22%	17%		
FRANK et al. 2016	russos		54,3%	14,3%		
ZEPEDA-LOPEZ et al. 2016	mexicanos		6,4%.			
presente estudo	pacientes do ICC	MMII	18,6%	0%	0%	

Apesar da grande variabilidade da detecção da mutação *BRAF* V600E nas populações estudadas, parece haver em todas as séries um padrão inverso entre elastose solar e frequência de mutação de *BRAF*, idade mais jovem entre os pacientes portadores de melanoma *BRAF* mutado e também um predomínio em áreas onde não há dano solar crônico. Para a mutação de *NRAS*, usualmente a idade é mais elevada e para mutação de *KIT* as séries demonstram no geral maior positividade para os melanomas do tipo acral lentiginoso.

Um padrão de melanomas cutâneos associados a mutação *BRAF* V600E tem sido reconhecido mesmo nas populações onde a prevalência desta mutação é muito inferior às encontradas nas populações caucasianas. Semelhante conclusão foi obtida por KIM et al. (2015) que hipotetizando um padrão diferente de prevalência da mutação *BRAF* V600E entre melanomas cutâneos de asiáticos quando comparados ao padrão das populações caucasianas, demonstrou numa metanálise as mesmas associações do melanoma primário mutado com a idade jovem, localização tronco, pele sem dano solar crônico, tipo extensivo superficial e casos mais avançados, apesar de ter havido apenas a metade da prevalência da mutação quando comparado às coortes de caucasianos.

No nosso estudo algumas diferenças parecem ir além do que apenas uma prevalência muito baixa da mutação de *BRAF* V600E (apenas 18,6% entre os casos validados, 19,5% considerando apenas os melanomas invasivos). De fato, não observamos entre os melanomas mutados *BRAF* V600E todas as características clínicas e anatomopatológicas descritas na literatura. Entre os melanomas mutados da nossa amostra, basicamente três semelhanças com a literatura foram observadas: 87,5% dos casos o fototipo variou de I a III, a detecção da mutação predominou entre os mais jovens e a elastose solar estava ausente ou insignificante em 75% dos casos. No entanto, embora poucos casos, as diferenças observadas na comparação com a literatura são bastante expressivas. Nenhum dos casos mutados tinham como sítio anatômico tronco, três casos (37,5%) localizavam-se em áreas de pele glabra e ainda um caso estava localizado na face,

caracteristicamente onde há fotodano mais pronunciado. Outro achado interessante é que apenas 37,5% eram do tipo extensivo superficial, a mesma percentagem de melanomas do tipo acral lentiginoso. As diferenças são reforçadas quando se observa os 35 casos *BRAF* V600E negativos. Em 36% dos casos negativos, o sítio anatômico era tronco e portanto o sítio anatômico reconhecido como o de maior probabilidade de detecção da mutação foi bem representado (29,5% de todas as amostras validadas). Pouco mais de 30% das amostras negativas ocorreram no sexo feminino, enquanto que na amostra positiva todos, exceto um caso (87,5%) ocorreram no sexo feminino, dado bem divergente do apresentado no “*The Cancer Genoma Atlas Network*” (Cancer Genome Atlas Network 2015) onde o sexo masculino representava a maioria entre os melanomas mutados (62%).

Melanomas acrais lentiginosos corresponderam na nossa casuística a 14,3% dos tipos histológicos e entre os mutados *BRAF* V600E, corresponderam a 37,5% dos casos. Análises de mutação por sequenciamento de DNA (ZEBARY et al. 2013) neste tipo de melanoma em uma população caucasiana procedente da Suécia demonstrou mutação de *BRAF* em 17%, *NRAS* em 15% , *KIT* em 15% enquanto na nossa casuística pouco mais de 33% dos melanomas acrais avaliados (35% de ensaios invalidados) apresentavam a mutação *BRAF* V600E e nenhum apresentava mutação de *NRAS* (100% das amostras testadas negativas, nenhum ensaio invalidado) e *KIT* (50% das amostras testadas negativas, 50% de ensaios invalidados).

Considerando que a mutação *BRAF* V600E não é uma típica mutação causada por radiação UVB (VENESIO et al. 2008; MASSAD et al. 2014), é possível que a baixa prevalência desta mutação em nossa casuística seja devido a maior heterogeneidade de fototipos de pele na nossa população bem como ao padrão de irradiação solar mais intenso e constante.

No nosso trabalho, a proposta da pesquisa da expressão IHQ da proteína mutada *BRAF* V600E foi baseada no recente trabalho de O'BRIEN et al. (2017) que descreveram sensibilidade de 88% e especificidade de 100% na detecção da mutação *BRAF* V600E por imunistoquímica utilizando-se o anticorpo específico para proteína mutada anti-BRAFV600E VE1 comparado ao teste de mutação *BRAF* V600E Cobas® 4800. Cada vez mais estudada, a expressão da proteína mutada tem sido comparada a métodos de detecção genética da mutação *BRAF* V600E. Comparando o *status* da mutação genética por RT-PCR e sequenciamento de Sanger com a expressão da proteína mutada, BRUNO et al. (2017) descreveram concordância de apenas 63% entre os três métodos e destacaram a importância da expressão da proteína mutada, confirmando na sua prática clínica a utilização de um método de detecção genética associada a confirmação da expressão da proteína mutada *BRAF* V600E para tomada de decisão, indicando até uma confirmação por um segundo método de detecção genética no caso de ausência de expressão IHQ da proteína mutada.

Na nossa casuística, entre 93 casos avaliados para a expressão IHQ de *BRAF* V600E (excetuados os não realizados e os não determinados)

aproximadamente 32% dos casos expressaram a proteína mutada. Seguindo o padrão reconhecido dos melanomas com mutação *BRAF* V600E, na nossa casuística a expressão da proteína mutada teve associação significativa com a idade mais jovem e com a ausência de elastose. Diferente da literatura, houve também associação com sexo feminino e não houve predominância entre os tipos extensivos superficiais, acontecendo em frequência discretamente maior entre os melanomas nodulares. Em 81,8% dos casos negativos para a mutação *BRAF* V600E por RT-PCR, a imunohistoquímica revelou-se negativa para a proteína *BRAF* V600E e 4 casos dentre sete realizados (57%) conhecidos para mutação *BRAF* V600E revelaram-se positiva para expressão IHQ citoplasmática demonstrando uma acurácia de aproximadamente 77%, números mais próximos, mas ainda inferiores aos 86% de concordância entre status negativo da mutação *BRAF* V600E e ausência de expressão IHQ de *BRAF* V600E e 78% de concordância entre a positividade do status da mutação e a expressão da proteína mutada do trabalho de HUGDAHL et al. (2016) que estudaram especificamente melanomas nodulares na Noruega. Atribuída por alguns (HUGDAHL et al. 2016) à heterogeneidade tumoral, a ausência de expressão IHQ da proteína mutada ocorreu em 3 casos positivos para mutação *BRAF* V600E. Mais estranho ainda, mas não exclusiva de nossa casuística, atribuída a possíveis reações cruzadas com mutações desconhecidas ou mesmo não avaliadas pelo método RT-PCR empregado, a positividade de expressão IHQ de *BRAF* V600E na ausência da detecção genética da mutação ocorreu em 6 casos.

Na nossa casuística decidimos estudar os genes supressores *PTEN* e *TP53* através de imunohistoquímica considerando a elevada frequência de deleções e outras aberrações que dificultariam a detecção de mutação pela metodologia RT-PCR. De fato, no estudo do MD Anderson Cancer Center, SIROY et al. (2015) mesmo utilizando uma moderna metodologia para a detecção de mutações por sequenciamento “*next generation*” (um painel de 46 genes) sugeriu que a metodologia empregada pode ter confundido os resultados de mutação em genes supressores que podem apresentar mutações do tipo *frameshift* em muitos *loci*, o que pode ter justificado a baixíssima taxa de mutação de *PTEN* (1,6%) naquele estudo. De fato, muito antes GULDBERG et al. (1997) já haviam observado em 25,6% de deleção homozigótica parcial ou completa do gene *PTEN* em linhagens de melanoma (9/35), uma deleção de único éxon numa linhagem celular e deleções de terminal 3´ e 5´ no restante das linhagens de melanoma utilizadas. Nenhuma linhagem celular com deleção homozigótica de *PTEN* demonstrou sinal na análise por RT-PCR. Considerando a frequência deste achado, esta metodologia certamente não seria interessante para a avaliação de inativação de *PTEN*. Também há controvérsias em relação a expressão imunohistoquímica de *PTEN* em melanomas. Enquanto alguns autores salientam a perda da expressão citoplasmática de *PTEN* nos melanomas por mecanismo bialélico de inativação funcional de *PTEN* (ZHOU et al. 2000) outros apontam como fator de mau prognóstico a forte expressão citoplasmática de *PTEN* (MEYER et al. 2012).

Considerada como uma mutação precoce no processo de cancerização, a mutação *BRAF* V600E por si não é suficiente para a malignização do melanócito, sendo aceito pela maioria dos autores a necessidade de pelo menos uma segunda mutação para a cancerização. Muitas vezes apontada como evento mais comum entre os mutados *BRAF* V600E, a mutação de *PTEN* é na maioria das vezes considerada o segundo passo na cancerização do melanócito. Na nossa casuística a perda de expressão de *PTEN* ocorreu em 17,2% dos casos avaliados e 35,6% apresentavam nula ou fraca expressão IHQ de *PTEN*. Embora a perda da expressão de *PTEN* tenha ocorrido na nossa casuística em aproximadamente 16% nos membros, sítio anatômico onde se concentrou a positividade para a mutação *BRAF* V600E, nenhuma associação da expressão de *PTEN* foi observada com a recidiva ou com a sobrevida, este último dado compatível com o trabalho de MIKHAIL et al. (2005), mas em desacordo com o trabalho de BUCHEIT et al. (2014).

Diferente das observações de TSAO et al. (2004) e CURTIN et al. (2005) que enfatizaram a necessidade da associação da mutação *BRAF* V600E e *PTEN*, além da sugestão da mutação exclusiva de *NRAS* na via de cancerização do melanoma, na nossa casuística não houve diferença significativa da expressão imunoistoquímica de *PTEN* entre os melanomas com e sem detecção da mutação *BRAF* V600E e nenhuma mutação de *NRAS* Q61L foi detectada mesmo entre os melanomas sem a mutação *BRAF* V600E. Entretanto, no trabalho de TSAO et al. (2004) os casos estudados eram de linhagem de cultura de melanoma e uma pequena parte

de melanomas metastáticos enquanto que no trabalho de CURTIN et al. (2005) foram incluídos também melanomas de mucosa, tendo sido estudados melanomas provenientes de 2 centros japoneses, 2 centros norte-americanos, 2 centros germânicos e um centro sul coreano, configurando não só populações de características bem divergentes da nossa população, bem como do padrão de exposição solar, justificando as diferenças encontradas na nossa casuística.

No nosso estudo consideramos avaliar a expressão de p53 por imuno-histoquímica, visto que há muitos anos a mutação de *TP53* é a que representa entre os genes mais conhecidos, as mutações induzidas por UVR (ZERP et al. 1999). No estudo de HODIS et al. (2012) ficou bem demonstrado que o gene *TP53* foi o que apresentou a maior frequência de mutações características das induzidas pela UVR enquanto que as mutações dos genes *BRAF* e *NRAS* não apresentavam base molecular da assinatura UV. Além disso, o estudo de VIROS et al. (2014) comprovou a importância da mutação de *TP53* como gatilho de cancerização também nos melanomas com a mutação *BRAF V600E*. Considerando a nossa casuística como uma amostra de uma população cronicamente exposta ao sol, a expressão IHQ nuclear de p53 pode explicar em parte a biologia molecular entre os melanomas cutâneos de nosso meio.

Em toda nossa casuística, a exemplo da literatura, os fototipos I a III predominaram e nenhum fototipo VI foi identificado. Houve uma associação inversa estatisticamente significativa entre fototipo e a expressão IHQ de p53 na nossa casuística ($p=0,037$). Quase metade dos casos em que era nula ou

insignificante a expressão IHQ de p53 (até 1% da área tumoral) ocorreu no fototipo IV, fototipo onde ocorreu apenas 1 caso de detecção da mutação *BRAF* V600E. Além disso quase metade dos fototipos IV (47,4%) não apresentaram expressão IHQ significativa de p53. Também 83% dos casos de fototipo II, 100% dos casos de fototipo I e 85,2% dos fototipos I a III apresentavam expressão significativa de p53. Considerada como uma mutação relacionada a radiação UV, a expressão mais significativa de p53, aceita como consequência em parte da maior estabilidade da proteína mutada, pode significar uma possível via de malignização para fototipos mais baixos na nossa casuística. Na região da cabeça e pescoço, embora a perda da expressão de PTEN tenha sido de aproximadamente 42%, uma significativa expressão de p53 (acima de 10% da área tumoral) ocorreu em quase 92% dos casos, confirmando o possível papel da mutação de *TP53* entre melanomas da cabeça e pescoço, derivados de um padrão de exposição UV mais constante e elevado.

Considerado como guardião do genoma e associado a muitas neoplasias, o *TP53* tem sido pouco estudado em melanomas cutâneos após a década de 90. De acordo com HUSSEIN et al. (2003) o *TP53* é um gene de resposta a estresse que codifica uma proteína de 53KDa oncosupressiva nuclear cuja função primordial é manter a estabilidade genômica e induzir apoptose em resposta a danos genômicos.

No entanto, o significado biológico da expressão da proteína p53 deve ser interpretado com cautela visto que pode significar o acúmulo da proteína mutada mais estável e de meia vida mais longa ou mesmo o acúmulo da

proteína selvagem por estabilização e maior biodisponibilidade secundário ao dano do DNA conforme trabalho de HALL e LANE (1994). Embora alguns autores descrevam para tumores internos uma concordância entre a mutação do gene *TP53* e a expressão da proteína mutada, AKSLEN et al. (1998) estudando mutação de *TP53* em melanomas cutâneos nodulares, não conseguiu demonstrar uma associação entre os seus resultados de mutação de *TP53* e a expressão IHQ de p53.

Por ser de expressão nuclear, mesmo entre os melanomas cutâneos mais pigmentados, a avaliação não é prejudicada pela interferência do pigmento melanina, de localização citoplasmática. Na presente casuística a sua expressão foi negativa ou insignificante em 21% dos casos e nos casos positivos, a maioria marcou entre 10 e 30% da área tumoral. Não houve associação significativa com a idade, *status* de mutação *BRAF* V600E, intensidade de expressão IHQ de *BRAF* V600E. Em comparação a um dos maiores estudos com controle clínico-patológico (WHITEMAN et al. 1998), a prevalência de positividade de p53 na nossa casuística é praticamente inversa, mesmo quando excluídos os tipos histológicos lentigo maligno e acral lentiginoso, tipos histológicos não presentes naquela casuística. Na casuística de WHITEMAN et al. (1998) havia 81,8% de melanomas sem expressão significativa de p53 (<1% da área tumoral). Naquela casuística embora quase 32% dos casos positivos para p53 fossem de localização cabeça e pescoço, apenas 28% dos melanomas de cabeça e pescoço apresentavam positividade para p53 e entre os pacientes acima de 70 anos, 84% havia expressão de P53. Na nossa casuística 77,8% dos maiores de 70

anos apresentavam expressão significativa de p53, mas aproximadamente 92% dos melanomas da cabeça e pescoço apresentavam expressão significativa de p53. Naquele estudo a expressão IHQ de significativa foi mais prevalente entre os pacientes com inabilidade de bronzeamento característica própria dos fototipos baixos (o autor não classificou por fototipo) coincidindo com o nosso estudo onde 83% dos melanomas de pele fototipo II e 100% (2 casos) de fototipo I apresentavam expressão IHQ significativa (>1 %) de p53.

Ficou patente a elevada prevalência na nossa casuística da expressão IHQ de p53 (79%), uma diferença significativa quando comparada com a casuística de WHITEMAN et al. (1998, p.845), (18%), bem como com as outras casuísticas por estes autores citadas: CRISTOFOLINI et al. 1993 (34%), LASSAN et al. 1993 (18%), STRAUME e AKSLEN (1993) (5%) e SPAROW et al. 1995 (12%) utilizando-se o mesmo anticorpo DO-7.

Mais recentemente utilizando também os anticorpos p53-DO-7, VÄISÄNEN et al. (2010) na Finlândia, utilizando como critério negativo para expressão de p53 a presença de expressão IHQ em menos de 2% de células malignas, revelou que apenas 18 casos dentre 153 analisados (11,7%) apresentavam imunoexpressão de p53 em mais do que 10% da área tumoral e em 46% dos casos não havia expressão IHQ de p53 (71 de 153 casos). No nosso trabalho 60% dos casos apresentavam mais do que 10% da área tumoral com expressão IHQ de p53, 20% dos casos mais de 50% da área tumoral, enquanto que em apenas 21% não havia expressão

IHQ de p53, ou seja, menos da metade quando comparada a esta última coorte finlandesa.

Um estudo brasileiro de melanomas extensivos superficiais (DE SÁ et al. 2009) observou a expressão IHQ de p53 acima de 10% da área tumoral em 32,8% das amostras avaliáveis dos tumores primários, menos da metade da frequência encontrada no presente estudo quando consideramos a expressão IHQ acima de 10% apenas entre melanomas extensivos superficiais (68,4%). Nenhuma associação entre sobrevida e expressão de p53 foi observada naquele estudo, embora quase metade da casuística tenha sido de melanomas finos (até 1mm) com uma maior prevalência de expressão de p53 entre os melanomas mais espessos.

Avaliando apenas os melanomas invasivos do presente estudo, a expressão IHQ de p53 categorizada para até 10% da área tumoral e acima de 10% teve impacto significativo numa análise univariada da sobrevida livre de recorrência ($p=0,038$), mas não na sobrevida global. Quando o parâmetro empregado foi expressão IHQ de p53 em até 1% da área tumoral e acima de 1%, o impacto deste fator na análise univariada aconteceu tanto na análise da sobrevida global ($p=0,006$) quanto da sobrevida livre de recorrência ($p=0,001$), impacto este mantido na análise multivariada da sobrevida livre de recorrência ($p=0,006$; *Hazard risk* = 0,199; Intervalo de confiança: 0,054 a 0,626) entre os parâmetros histopatológicos índice de Breslow, subtipo histológico, nível de Clark e ulceração.

Embora a presença da expressão IHQ de p53 não possa ser considerada tão somente como consequência biológica da mutação do gene

TP53, a própria estabilização da proteína selvagem como possível explicação da expressão IHQ de p53 pode apontar na nossa casuística para uma medida indireta de dano UV ao DNA e estresse celular decorrente de severa exposição solar.

Mesmo não sendo o objetivo principal deste estudo uma avaliação da sobrevida e de fatores que levaram a recidiva foram estudados, uma vez que 77% dos casos foram incluídos no estudo antes do tratamento ou dentro de um ano após o tratamento realizado, tempo usualmente insuficiente para a ocorrência da maioria dos eventos de recorrência da doença.

Pouco estudado em relação a sobrevida em séries de melanoma cutâneos, na nossa casuística a expressão de p53 foi inversamente associada ao evento recidiva sistêmica bem como sua expressão mostrou-se fator protetor em relação à sobrevida global e à sobrevida livre de recorrência, esta última até mesmo em análise multivariada com os fatores anatomopatológicos Breslow, Clark e subtipo histológico, classicamente considerados dentre os mais importantes fatores prognósticos do melanoma cutâneo primário. Estes dados se mantêm mesmo quando é realizada a análise excluindo-se os melanomas *in situ*.

Ao contrário da nossa casuística, onde a imunoexpressão de p53 aparece claramente como fator prognóstico protetor (considerando a casuística total e apenas os melanomas invasivos), numa série finlandesa (VÄISÄNEN et al. 2010) os casos positivos para expressão IHQ de p53 apresentaram uma tendência a metastização com uma sobrevida específica de doença em 5 anos significativamente menor (66% contra 87%; $p=0,005$)

muito embora na análise multivariada não tenha se mantido como fator independente significativo ($p > 0,05$).

As diferenças encontradas na associação entre a expressão IHQ de p53 e sobrevida no presente estudo e no estudo finlandês deve ser interpretado a luz do significado biológico da imunoexpressão de p53. De acordo com a literatura a expressão IHQ de p53 pode ser atribuída à presença da proteína mutada ou à estabilização e aumento da biodisponibilidade da proteína selvagem. Na coorte estudada, a expressão de p53 possivelmente reflita muito mais casos de acúmulo da proteína p53 WT do que verdadeiramente expressão da mutação de *TP53*, enquanto que na população finlandesa estudada, com prevalência de fototipos mais baixos e padrão de exposição solar diferente (dados não explorados naquele estudo), a expressão IHQ de p53 represente em si, de fato, a presença da proteína p53 mutada na maioria dos casos. Desta forma, possivelmente melanomas p53 positivos representariam dois tipos biomoleculares de melanomas cutâneos, um associado a dano solar crônico sem mutação de p53 (acúmulo de p53 WT por danos ao DNA e possíveis outras mutações não conhecidas) e outro associado verdadeiramente à mutação de *TP53*. É razoável hipotetizar que melanomas cutâneos com expressão IHQ de p53 por aumento da biodisponibilidade da proteína p53 selvagem com ação oncosupressora mantida, dentro do fenômeno de cancerização, tenham uma evolução menos agressiva do que melanomas na qual a expressão IHQ de p53 represente propriamente a proteína mutada não funcionante produto de mutação somática ou deleções do gene *TP53*.

Mesmo sem a clara explicação deste aparente paradoxo, a expressão de p53 pode ser considerada como um fator prognóstico a mais na avaliação do melanoma cutâneo. Possivelmente em regiões onde a taxa de expressão IHQ de p53 nos melanomas cutâneos é baixa, esta represente a infrequente mutação somática do gene *TP53*, conforme apontavam HUSSEIN et al. (2003) e WU et al. (2018) estando relacionada diretamente à malignização do melanócito. Em regiões onde melanomas apresentam elevada expressão IHQ de p53, a exemplo da nossa casuística, é plausível que a explicação seja o acúmulo da proteína selvagem ainda com função oncossupressora como resposta a estresse celular, possivelmente relacionado a um padrão de exposição severo e contínuo a UVR numa população de fototipos de pele mais variados.

Seja conseqüente à mutação/deleção de *TP53* ou mesmo a maior disponibilidade da proteína selvagem por dano celular, a prevalência importante e superior às outras casuísticas aqui descritas apontam para uma via de exposição solar crônica como um dos principais fatores causadores do melanoma cutâneo na população estudada, haja visto a mutação de *TP53* ser considerada como assinatura UV e o acúmulo da proteína selvagem ser considerado secundário ao dano celular e sobretudo do DNA, muito provavelmente pela UVR.

Associada às informações da frequente presença de elastose solar e da baixa prevalência encontrada da mutação *BRAF* V600E, esta ainda em tipos histológicos e sítios anatômicos incharacterísticos (ausentes no sítio tronco entre os casos validados), a expressão IHQ de p53 pode ser mais

uma diferença biomolecular encontrada dentro da nossa casuística em comparação com a literatura. A significativa expressão de p53 pode apontar para uma via de malignização própria da nossa região, secundária a dano solar crônico em uma população miscigenada, seja por mutação de *TP53*, seja por outras mutações ainda não identificadas que resultariam na maior biodisponibilidade de p53 selvagem vista na IHQ.

Uma população com baixa prevalência de mutação *BRAF/NRAS* e com uma significativa predominância de expressão IHQ de p53 representa um claro desafio terapêutico na era das terapias alvo, especialmente considerando o trabalho de MAR et al. (2013) que apontam para os melanomas *BRAF/NRAS* selvagem possivelmente várias vias de cancerização.

Novas drogas com potencial de estabilização de p53 selvagem (WU et al. 2018) redimensionam a necessidade do estudo de *TP53* nos melanomas cutâneos de nosso meio, considerando a relevância do achado da imunoexpressão de p53 nesta casuística associada a baixa prevalência de mutações reconhecidas como alvo terapêuticos.

Fatores diversos, em especial a miscigenação característica da nossa população e a intensa e contínua exposição à radiação ultravioleta que caracteriza a nossa região, pode ser a explicação para as diferenças biomoleculares que encontramos quando comparamos os resultados da população estudada aos resultados encontrados na literatura internacional, em especial de populações caucasianas.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, sexo feminino, fototipo II e sítio tronco predominaram. A elastose solar moderada a severa estava presente em quase um terço da casuística. O microestadiamento patológico demonstrou melanomas primários avançados, mas os fatores clínicos e histopatológicos que apresentaram impacto significativo na sobrevida global e associação com recidiva estão de acordo com a literatura.

A prevalência da mutação *BRAF* V600E na população estudada de 93 casos (43 validados) foi significativamente mais baixa do que a esperada na literatura para população caucasiana, mas assemelhou-se com algumas populações não caucasianas. O padrão clínico-patológico do melanoma cutâneo mutado *BRAF* V600E da população estudada divergiu parcialmente do padrão apresentado na literatura.

A prevalência de mutação de *NRAS* Q61L e *KIT* V559A em nosso meio não pôde ser avaliada, uma vez que não houve um só caso detectado.

A expressão IHQ de *BRAF* V600E foi mais específica do que sensível em relação a detecção da mutação genética por qPCR, exame padrão ouro considerado neste estudo. A perda de expressão de *PTEN* apresentou prevalência inferior ao relatado na literatura, inclusive entre os melanomas mutados *BRAF* V600E. A expressão de p53 foi mais prevalente do que a encontrada na literatura e apresentou-se como fator de bom prognóstico para a sobrevida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. **Int J Biochem Cell Biol** 1999; 31:1037-51.

Ashman LK, Griffith R. Therapeutic targeting of c-KIT in cancer. **Expert Opin Investig Drugs** 2013; 22:103-15.

Akslen LA, Monstad SE, Larsen B, Straume O, Ogreid D. Frequent mutations of the p53 gene in cutaneous melanoma of the nodular type. **Int J Cancer** 1998; 79:91-5.

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.

Barnhill RL, Mibm Jr MC. Histopathology and precursor lesions. In: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S, editors. **Cutaneous melanoma**. 3rd ed. St. Louis: Quality Medical Publishing; 1996. p.126-30.

Bauer J, Büttner P, Murali R, et al. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. **Pigment Cell Melanoma Res** 2011; 24:345-51.

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

Begg CB, Hummer AJ, Mujumdar U et al. A design for cancer case-control studies using only incident cases: experience with the GEM study of melanoma. **Int J Epidemiol** 2006; 35:756-64.

Bertolli E, de Macedo MP, Pinto CA et al. Evaluation of melanoma features and their relationship with nodal disease: the importance of the pathological report. **Tumori** 2015; 101:501-5

Blum A, Ingvar C, Avramidis M, et al. Time to diagnosis of melanoma: same trend in different continents. **J Cutan Med Surg** 2007; 11:137-44.

Bruno W, Martinuzzi C, Andreotti V, et al. Heterogeneity and frequency of BRAF mutations in primary melanoma: Comparison between molecular methods and immunohistochemistry. **Oncotarget** 2017; 8:8069-8082.

Buchheit AD, Chen G, Siroy A, et al. Complete loss of PTEN protein expression correlates with shorter time to brain metastasis and survival in stage IIIB/C melanoma patients with BRAFV600 mutations. **Clin Cancer Res** 2014; 20:5527-36.

Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. **Cell** 2015; 161:1681-96.

Carli P, Palli D. Re: Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:1801.

Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. **JAMA** 2011; 305:2327-34.

Chappell WH, Steelman LS, Long JM, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. **Oncotarget** 2011; 2:135-64.

Chardon A, Cretois I, Hourseau C. Skin colour typology and suntanning pathways. **Int J Cosmet Sci** 1991; 13:191-208.

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

Corrêa Mde P. Solar ultraviolet radiation: properties, characteristics and amounts observed in Brazil and South America. **An Bras Dermatol** 2015; 90:297-313.

Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **N Engl J Med** 2005; 353:2135-47.

D'Ischia M, Wakamatsu K, Napolitano A, et al. Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols. **Pigment Cell Melanoma Res** 2013; 26:616-33.

Dasgupta A, Katdare M. Ultraviolet radiation-induced cytogenetic damage in white, hispanic and black skin melanocytes: a risk for cutaneous melanoma. **Cancers (Basel)** 2015; 7:1586-604.

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature** 2002; 417:949-54.

Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. **Oncogene** 2010; 29:5545-55.

Del Bino S, Bernerd F. Variations in skin colour and the biological consequences of ultraviolet radiation exposure. **Br J Dermatol** 2013; 169:33-40.

Del Carpio RZ. Situación del melanoma maligno cutáneo en el Hospital Military Central Lima 1985–2007. **Dermatol Perú** 2008; 18:267-83.

Dennis LK. Analysis of the melanoma epidemic, both apparent and real: data from the 1973 through 1994 surveillance, epidemiology, and end results program registry. **Arch Dermatol** 1999; 135:275-80.

de Sá BC, Fugimori ML, Ribeiro Kde C, Duprat Neto JP, Neves RI, Landman G. Proteins involved in pRb and p53 pathways are differentially expressed in thin and thick superficial spreading melanomas. **Melanoma Res** 2009; 19:135-41.

Dibb NJ, Dilworth SM, Mol CD. Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:718-27.

Domingo E, Schwartz S. BRAF. **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol** 2004; 8:302-6.

Estrozi B, Machado J, Rodriguez R, Bacchi CE. Clinicopathologic findings and BRAF mutation in cutaneous melanoma in young adults. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2014; 22:57-64.

Fajardo-Ramírez ÓR, Salas-Alanis JC, Guzmán-Huerta E, et al. BRAF mutations among patients from the Northeast of Mexico with malignant melanoma. **Rev Invest Clin** 2014; 66:288-90.

Fajuyigbe D, Young AR. The impact of skin colour on human photobiological responses. **Pigment Cell Melanoma Res** 2016; 29:607-618.

Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, et al. Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. **N Engl J Med** 2017; 376:2211-22.

Ferreira FR, Nascimento LF. Mortality due to cutaneous melanoma in south region of Brazil: a spatial approach. **An Bras Dermatol** 2016; 91:437-41.

Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Arch Dermatol** 1988; 124:869-71.

Frank GA, Aleksakhina SN, Zavalishina LE, et al. BRAF and NRAS mutations in Russian melanoma patients: results of a nationwide study. **Melanoma Res** 2016; 26:442-7.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. **Eur J Cancer** 2005; 41:45-60.

Garbe C, McLeod GR, Buettner PG. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. **Cancer** 2000; 89:1269-78.

Guldberg P, Straten P, Birck A, Ahrenkiel V, Kirkin AF, Zeuthen J. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. **Cancer Res** 1997; 57:3660-3.

Hall HI, Miller DR, Rogers JD, Bewerse B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. **J Am Acad Dermatol** 1999; 40:35-42.

Hall PA, Lane DP. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?--Revisited! **J Pathol** 1994; 172:1-4.

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

Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. **Cell** 2012 Jul 20; 150:251-63.

Horenstein MG, Norton CL, Evans TN. Displacement of dermal solar elastosis in malignant melanoma. **J Cutan Pathol** 2007; 34:376-80.

Hugdahl E, Kalvenes MB, Puntervoll HE, Ladstein RG, Akslen LA. BRAF-V600E expression in primary nodular melanoma is associated with aggressive tumour features and reduced survival. **Br J Cancer** 2016; 114:801-8.

Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. p53-related pathways and the molecular pathogenesis of melanoma. **Eur J Cancer Prev** 2003; 12:93-100.

[INPE] Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Centro de previsão de tempo e Estudos climatéricos**. Disponível em: <URL:<http://satelite.cptec.inpe.br>> [2017 dez 9]

Ito S, Jimbow K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanomas. **J Invest Dermatol** 1983; 80:268-72.

Jemal A, Devesa SS, Fears TR, Hartge P. Cancer surveillance series: changing patterns of cutaneous malignant melanoma mortality rates among whites in the United States. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:811-8.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. **CA Cancer J Clin** 2008; 58:71-96.

Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. **Adv Cancer Res** 2009; 102:19-65.

Jimbow K, Quevedo WC Jr, Fitzpatrick TB, Szabo G. Some aspects of melanin biology: 1950-1975. **J Invest Dermatol** 1976; 67:72-89.

Kim BY, Han MJ, Chung AS. Effects of reactive oxygen species on proliferation of Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. **Free Radic Biol Med** 2001; 30:686-98.

Kim SY, Kim SN, Hahn HJ, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. Metaanalysis of BRAF mutations and clinicopathologic characteristics in primary melanoma. **J Am Acad Dermatol** 2015; 72:1036-46.e2.

Kvaskoff M, Pandeya N, Green AC, et al. Solar elastosis and cutaneous melanoma: a site-specific analysis. **Int J Cancer** 2015; 136:2900-11.

Landi MT, Bauer J, Pfeiffer RM, et al. MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma. **Science** 2006; 313:521-2.

Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. **Br J Dermatol** 2011; 164:776-84.

Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell** 2010; 141:1117-34.

Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. **Br J Dermatol** 2004; 150:179-85.

Long GV, Hauschild A, Santinami M, et al. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. **N Engl J Med** 2017; 377:1813-23.

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.

Mackie RM, Bray CA, Leman JA. Effect of public education aimed at early diagnosis of malignant melanoma: cohort comparison study. **BMJ** 2003; 326:367.

Mar VJ, Wong SQ, Li J, et al. BRAF/NRAS wild-type melanomas have a high mutation load correlating with histologic and molecular signatures of UV damage. **Clin Cancer Res** 2013; 19:4589-98.

Massad C, Loya A, Taraif S, et al. BRAF mutation status in primary and metastatic melanomas in two regions with differing potential ultraviolet radiation exposure. **Clin Exp Dermatol** 2014; 39:932-43.

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochim Biophys Acta** 2007; 1773:1263-84.

Mendes GL, Koifman RJ, Koifman S. Mortality frequency and trends attributed to melanoma in Brazil from 1980-2005. **J Toxicol Environ Health A** 2010; 73:850-7.

Meyer S, Fuchs TJ, Bosserhoff AK, et al. A seven-marker signature and clinical outcome in malignant melanoma: a large-scale tissue-microarray study with two independent patient cohorts. **PLoS One** 2012; 7:e38222.

Mikhail M, Velazquez E, Shapiro R, et al. PTEN expression in melanoma: relationship with patient survival, Bcl-2 expression, and proliferation. **Clin Cancer Res** 2005; 11:5153-7.

Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA Cancer J Clin** 2016; 66:271-89.

Mitra D, Luo X, Morgan A, et al. An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. **Nature** 2012; 491:449-53.

Monzon J, Liu L, Brill H, et al. CDKN2A mutations in multiple primary melanomas. **N Engl J Med** 1998; 338:879-87.

Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, et al. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. **N Engl J Med** 2014; 370:599-609.

Mulliken JS, Russak JE, RIGEL DS. The effect of sunscreen on melanoma risk. **Dermatol Clin** 2012; 30:369-76.

O'Brien O, Lyons T, Murphy S, Feeley L, Power D, Heffron CCB. BRAF V600 mutation detection in melanoma: a comparison of two laboratory testing methods. **J Clin Pathol** 2017; 70:935-40.

Ossio R, Roldán-Marín R, Martínez-Said H, Adams DJ, Robles-Espinoza CD. Melanoma: a global perspective. **Nat Rev Cancer** 2017; 17:393-4.

Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS ONE** 2011; 6:e17063.

Pershing LK, Tirumala VP, Nelson JL, et al. Reflectance spectrophotometer: the dermatologists' sphygmomanometer for skin phototyping? **J Invest Dermatol** 2008; 128:1633-40.

Pines G, Huang PH, Zwang Y, White FM, Yarden Y. EGFRvIV: a previously uncharacterized oncogenic mutant reveals a kinase autoinhibitory mechanism. **Oncogene** 2010; 29:5850-60.

Prota G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. **J Invest Dermatol** 1980; 75:122-7.

Qi RQ, He L, Zheng S, et al. BRAF exon 15 T1799A mutation is common in melanocytic nevi, but less prevalent in cutaneous malignant melanoma, in Chinese Han. **J Invest Dermatol** 2011; 131:1129-38.

Rebecca VW, Sondak VK, Smalley KS. A brief history of melanoma: from mummies to mutations. **Melanoma Res** 2012; 22:114-22.

Rigel DS. The effect of sunscreen on melanoma risk. **Dermatol Clin** 2002; 20:601-6.

Sakr RA, Barbashina V, Morrogh M, et al. Protocol for PTEN expression by immunohistochemistry in formalin-fixed paraffin-embedded human breast carcinoma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2010; 18:371-4.

Sakaizawa K, Ashida A, Uchiyama A, et al. Clinical characteristics associated with BRAF, NRAS and KIT mutations in Japanese melanoma patients. **J Dermatol Sci** 2015; 80:33-7.

Sakaizawa K, Goto Y, Kiniwa Y, et al. Mutation analysis of BRAF and KIT in circulating melanoma cells at the single cell level. **Br J Cancer** 2012; 106:939-46.

Schmerling RA, Loria D, Cinat G, et al. Cutaneous melanoma in Latin America: the need for more data. **Rev Panam Salud Publica** 2011; 30:431-8.

Schuch AP, Yagura T, Makita K, et al. DNA damage profiles induced by sunlight at different latitudes. **Environ Mol Mutagen** 2012; 53:198-206.

Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. **Mol Oncol** 2011; 5:124-36.

Si L, Kong Y, Xu X, et al. Prevalence of BRAF V600E mutation in Chinese melanoma patients: large scale analysis of BRAF and NRAS mutations in a 432-case cohort. **Eur J Cancer** 2012; 48:94-100.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2017; 67:7-30.

Simon JD, Peles D, Wakamatsu K, Ito S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. **Pigment Cell Melanoma Res** 2009; 22:563-79.

Siroy AE, Boland GM, Milton DR, et al. Beyond BRAFV600: clinical mutation panel testing by next-generation sequencing in advanced melanoma. **J Invest Dermatol** 2015; 135:508-515.

Soarez E. **Miscigenação nos trópicos: tristeza ou alegria?** Fortaleza: Imprece; 2006. 168p.

Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. **Leukemia** 2004; 18:189-218.

Thomas NE, Kricger A, From L, et al. Associations of cumulative sun exposure and phenotypic characteristics with histologic solar elastosis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2010; 19:2932-41.

Thomas NE, Edmiston SN, Alexander A, et al. Association Between NRAS and BRAF Mutational Status and Melanoma-Specific Survival Among Patients With Higher-Risk Primary Melanoma. **JAMA Oncol** 2015; 1:359-68.

Thompson JF, Soong SJ, Balch CM, et al. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. **J Clin Oncol** 2011; 29:2199-205.

Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. **J Invest Dermatol** 2004; 122:337-41.

Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. **Genes Dev** 2012; 26:1131-55.

Uitto J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. **J Drugs Dermatol** 2008; 7:s12-6.

Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. **Cell** 1990; 61:203-12.

Väisänen A, Kuvaja P, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. A prognostic index in skin melanoma through the combination of matrix metalloproteinase-2, Ki67, and p53. **Hum Pathol** 2011; 42:1103-11.

van der Mei IA, Blizzard L, Stankovich J, Ponsonby AL, Dwyer T. Misclassification due to body hair and seasonal variation on melanin density estimates for skin type using spectrophotometry. **J Photochem Photobiol B** 2002; 68:45-52.

Vazquez V de L, Silva TB, Vieira Mde A, et al. Melanoma characteristics in Brazil: demographics, treatment, and survival analysis. **BMC Res Notes** 2015; 8:4.

Venesio T, Chiorino G, Balsamo A, et al. In melanocytic lesions the fraction of BRAF V600E alleles is associated with sun exposure but unrelated to ERK phosphorylation. **Mod Pathol** 2008; 21:716-26.

Viros A, Sanchez-Laorden B, Pedersen M, et al. Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. **Nature** 2014; 511:478-82.

Whiteman DC, Parsons PG, Green AC. p53 expression and risk factors for cutaneous melanoma: a case-control study. **Int J Cancer** 1998; 77:843-8.

Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, Hughes MC, Hayward NK, Green AC. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:806-12.

Whiteman DC, Wilson LF. The fractions of cancer attributable to modifiable factors: a global review. **Cancer Epidemiol** 2016; 44:203-21.

Wilson MA, Nathanson KL. Molecular testing in melanoma. **Cancer J** 2012; 18:117-23.

Wu CE, Esfandiari A, Ho YH, et al. Targeting negative regulation of p53 by MDM2 and WIP1 as a therapeutic strategy in cutaneous melanoma. **Br J Cancer** 2018; 118:495-508.

Zebary A, Omholt K, Vassilaki I, et al. KIT, NRAS, BRAF and PTEN mutations in a sample of Swedish patients with acral lentiginous melanoma. **J Dermatol Sci** 2013; 72:284-9.

Zepeda-Lopez PD, Salas-Alanis JC2, Toussaint-Caire S, et al. BRAF Mutation (V600E) Prevalence in Mexican Patients Diagnosed with Melanoma. **Case Rep Oncol** 2016; 9:241-5.

Zerp SF, van Elsas A, Peltenburg LT, Schrier PI. p53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis. **Br J Cancer** 1999; 79:921-6.

Zhou XP, Gimm O, Hampel H, Niemann T, Walker MJ, Eng C. Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. **Am J Pathol** 2000; 157:1123-8.

Anexo 1 - Pareceres do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



Fortaleza, 14 de outubro de 2011.

Processo 033/2011 - Estudo da fluorescência da melanina pela técnica de excitação por dois fótons em melanoma de pele.

Pesquisador (a) Responsável: Márcio Studart Ribeiro da Fonseca

Informamos que o projeto de sua responsabilidade, acima referenciado, foi apresentado na reunião do CEP, de 29/09/2011, merecendo o seguinte parecer: **aprovado.**

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marcelo Gurgel Carlos da Silva', is written over a faint, large, stylized blue graphic in the background.

Prof. Dr. Marcelo Gurgel Carlos da Silva
Presidente
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP
Instituto do Câncer do Ceará - ICC

R. Papi Júnior, 1222 – Rodolfo Teófilo
Fone: (85) 3288.4400 | Fax: (85) 3281.2865
CEP: 60.430-230 – Fortaleza/CE

Escola Cearense de Oncologia - ECO
Fone/Fax: (85) 3288.4653





Fortaleza, 30 de julho de 2013.

Processo 025/2013 – Adendo “PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO DE BRAF, NRAS E C-KIT E EXPRESSÃO DE PTEN EM MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS TRATADOS NO HOSPITAL HAROLDO JUAÇABA DO INSTITUTO DO CÂNCER DO CEARÁ E SUA CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E COM FOTOTIPO DA PELE” ao projeto Estudo da fluorescência da melanina pela técnica de excitação por dois fótons em melanoma de pele.

Pesquisador (a) Responsável: Márcio Studart Ribeiro da Fonseca

Informamos que o Adendo ao projeto de sua responsabilidade, acima referenciado, foi apresentado na reunião do CEP, de 30/07/2013, merecendo o seguinte parecer: **aprovado.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Marcelo Gurgel Carlos da Silva

Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP
Instituto do Câncer do Ceará - ICC



Apêndice 1 - Ficha Fototipo

**ESTUDO DA FLUORESCÊNCIA DA MELANINA PELA
TÉCNICA DE EXCITAÇÃO POR DOIS FÓTONS EM
MELANOMA DE PELE**

1. ID (não preencher) _____
2. NOME _____
3. PRONTUÁRIO _____
4. DATA DO PREENCHIMENTO ____/____/____
5. ENDEREÇO ATUAL _____
6. TELEFONE _____
7. Nº DA BIÓPSIA (TU PRIMÁRIO) _____
8. FOTOTIPO DA PELE (FITZPATRICK)
1 – I 2 – II 3 – III 4 – IV 5 – V 6 – VI
9. TIPO DE MELANOMA
1- Nodular 2- Extensivo Superficial 3- Acral 4- Subungueal 5- Lentigo
Maligno Melanoma 6- Não classificável 7- IN SITU
10. LOCALIZAÇÃO DO MELANOMA PRIMÁRIO
1- Face 2- Pescoço 3- Tronco anterior 4- Tronco posterior 5 –
Membros superiores 6- Membros inferiores 7- Palma 8- Planta
9-Subungueal mão 10 – Subungueal pé

Apêndice 2 - Ficha Clínica

1. RG: _____(não preencher)-----|_|
NOME: _____
FONES PARA CONTATO _____
2. PRONTUÁRIO: _____
3. IDADE: _____anos-----|_|
4. SEXO: (1) M (2)F -----|_|
5. PROCEDÊNCIA (1) zona urbana __ (2) zona rural _____--|_|
6. PROFISSÃO (1) agricultor (2) comerciante (3) prof liberal (4) outro-----|_|
7. DATA DA PRIMEIRA CONSULTA : ____/____/____ ---|_|_|_|
8. LOCALIZAÇÃO DO MELANOMA 1- Face 2- Pescoço 3- Tronco anterior 4-
Tronco posterior 5 – Membros superiores (_____) 6- Membros
inferiores (_____) 7- Palma 8- Planta 9-Subungueal mão
10 – Subungueal pé-----|_|
9. LOCALIZAÇÃO EM ÁREA DESNUDA (EXPOSTA AO SOL) (0) não (1) sim -----
-----|_|
10. TIPO CLÍNICO (1) nodular (2) extensivo superficial (3) acral lentiginoso (4)
Subungueal (5) Lentigo Maligno Melanoma (5) não avaliável – por
biópsia anterior (6) Não informado -----|_|_|_|
11. ULCERAÇÃO CLÍNICA NA ADMISSÃO (0) não (1) sim (2) não informado-----
-----|_|
12. SATELITOSE CLÍNICA NA ADMISÃO (0) não (1) sim (2) não informado-----
-----|_|
13. METÁSTASES EM TRÂNSITO NA ADMISSÃO (0) não (1) sim (2) não
informado -----|_|
14. METÁSTASES LINFONODAIS NA ADMISSÃO (0) não (1) sim (2) não
informado-----|_|
15. LOCALIZAÇÃO DAS BASES LINFONODAIS (0) não (1) parótida dir (2) parótida
esq (3) pescoço dir (4) pescoço esq (5) axila dir (3) axila esq (6) inguinal dir
(7) inguinal esq (8) ilíaca dir (9) ilíaco e |_|_|_|_|
16. METÁSTASES SISTÊMICAS NA ADMISSÃO (0) não (1)
sim: _____-----|_|
17. DATA DO INÍCIO DE TRATAMENTO ____/____/____--|_|_|_|

18. TRATAMENTO INICIAL (0) não (1) cirurgia (2) quimioterapia (3) radioterapia----
 ----- |__|
19. DATA DA CIRURGIA ___/___/___-----|__|__|__|
20. CIRURGIA (1) ressecção alargada (2) linfonodo sentinela (3) esvaziamento
 radical-----|__|__|
21. NÚMERO DE LINF. SENTINELAS POSITIVOS/EXCISADOS _____/_____
 ----- ___/____
22. ESAZIAMENTO POSITIVOS/TOTAL _____/____------_____/____
23. ESAZIAMENTO APÓS LINFONODO SENTINELA (0) não (1) sim--|__|
24. LINFONODOS ESAZIAMENTO PÓS LINFONODO
 SENTINELAPOSITIVO/TOTAL ___/___---___/___
25. TRAT. SISTÊMICO ADJUVANTE (0) não (1)rxt (2) qt (3) interferon-|__|
26. RECIDIVA (0) não (1) local (2) metástases em trânsito (3) linfonodos regionais
 (4)sistêmica _____-----|__|__|__|
27. DATA DA RECIDIVA ___/___/___ - -----|__|__|__|
28. TRATAMENTO DA RECIDIVA (0) não realizado (1)cirurgia (2)radioterapia (3)
 quimioterapia (4) Ipilimumab(5) vemurafenib |__|__|__|
29. DATA DA ÚLTIMA CONSULTA _____/_____/____------|__|__|__|
30. ESTADO NA ÚLTIMA CONSULTA -----|__|
- (1)vivo sem doença (2) vivo com doença (3) morte pelo Melanoma (4) morte por
 outras causas

FICHA PREENCHIDA POR: _____

Obs :

1. Na procedência especificar o nome do Município
2. Áreas expostas ao sol são aquelas que ficam fora das áreas cobertas por roupas de uso diário
3. Especificar entre os parênteses a localização mais precisa do Melanoma primário considerando dorso de mão e pé como membro superior e inferior respectivamente

Apêndice 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ESTUDO DA FLUORESCÊNCIA DA MELANINA PELA TÉCNICA DE EXCITAÇÃO POR DOIS FÓTONS EM MELANOMA DE PELE

Pesquisador: MARCIO RIBEIRO STUDART DA FONSECA

ORIENTADOR: Prof. Dr. RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO

CO-ORIENTADOR: Profa Dra DEYSI VIVIANA TENAZOA WONG

Pelo presente instrumento de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido você paciente está sendo convidado para participar de uma pesquisa no Hospital do Câncer do Instituto do Câncer do Ceará e Universidade Federal do Ceará. Esta pesquisa visa o estudo de um novo método de diagnóstico precoce do Melanoma que inicialmente será aplicado apenas em lâminas de biópsias. Para participar você precisa assinar este documento autorizando em duas vias (uma a ser anexada a ficha da pesquisa e outra a ser anexada ao seu prontuário) a utilização dos blocos de parafina dos exames de histopatológico (biópsias) que foram realizadas após a excisão do tumor (Melanoma). Nenhum procedimento cirúrgico ou exame adicional (colheita de sangue, exames de imagem) será necessário para a pesquisa ser realizada. Você tem a garantia de que as informações obtidas desta pesquisa guardarão sigilo de seu nome. O bloco de parafina da biópsia do seu tumor, armazenado no Laboratório de Patologia do Instituto do Câncer do Ceará será utilizado para o preparo de lâminas de exame histopatológico ficando garantido que haverá ainda lesão residual no bloco para o caso de estudos adicionais. Estas lâminas serão levadas a Berlim na Alemanha para a aplicação da técnica. Após as leituras realizadas as Lâminas serão trazidas de volta e armazenadas adequadamente no Laboratório de Patologia do Instituto do Câncer do Ceará. Também uma revisão do seu exame poderá ser realizado. Nenhum custo lhe será cobrado. Caso não queira participar desta pesquisa nenhuma retaliação acontecerá contra você e seu tratamento e acompanhamento continuarão normalmente.

Eu, _____, prontuário _____, RG _____, dou minha permissão para a utilização do bloco de parafina da peça da biópsia do tumor (Melanoma) para o preparo de novas lâminas de estudo histopatológico, para a aplicação da técnica da pesquisa em questão, inclusive dou minha permissão para que estas lâminas sejam levadas para fora do país para as leituras da pesquisa. Declaro também que foi explicado em palavras simples para o meu entendimento.

Fortaleza, ____/____/____

Assinatura do Paciente

Assinatura do Responsável (se paciente menor de 18 anos)

Assinatura da Testemunha

Assinatura do Médico Aplicador do TCLE

Apêndice 4 - Carta de Esclarecimento de uso de Material Histopatológico Para Novo Projeto Perfil da Mutação de Braf E NRAS em Melanomas Cutâneos Tratados no Hospital Haroldo Juaçaba - Instituto do Câncer do Ceará

Pesquisador: MARCIO RIBEIRO STUDART DA FONSECA

ORIENTADOR: Prof. Dr. RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO

CO-ORIENTADOR: Profa Dra DEYSI VIVIANA TENAZOA WONG

Por meio desta carta você paciente está sendo convidado a participar de um novo projeto de pesquisa no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará e Universidade Federal do Ceará. Esta nova pesquisa a ser realizada pelo mesmo pesquisador visa o estudo do perfil molecular dos Melanomas de Pele de uma série de pacientes que foram tratados ou que estejam em acompanhamento neste hospital. Da mesma forma que a proposta do projeto anterior, “ ESTUDO DA FLUORESCÊNCIA DA MELANINA PELA TÉCNICA DE EXCITAÇÃO POR DOIS FÓTONS EM MELANOMA DE PELE ”, esta pesquisa será realizada utilizando-se apenas o material de biópsia colhido e guardado no Laboratório de Patologia do Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará. Mais precisamente, este estudo utilizará apenas as lâminas e blocos de parafina de biópsia já colhidos e guardados, referentes a seu tumor primário (Melanoma) que já foi excisado (retirado). Da mesma forma que o projeto de pesquisa anterior, nenhum exame, retorno ou mesmo tratamento será necessário para esta pesquisa. Nenhum custo lhe será cobrado. Desta forma, apenas as biópsias já realizadas (e armazenadas no hospital) serão utilizadas, garantindo sempre o sigilo (não identificação das pessoas envolvidas no estudo) e a manutenção da integridade do bloco de parafina para o caso de necessidade para revisão de lâminas, ou seja, ainda estará disponível o seu bloco de parafina que continuará armazenado neste hospital conforme legislação própria. Como você paciente já havia nos dado

o seu consentimento para a realização do estudo anterior “ ESTUDO DA FLUORESCÊNCIA DA MELANINA PELA TÉCNICA DE EXCITAÇÃO POR DOIS FÓTONS EM MELANOMA DE PELE ” nós estamos lhe enviando esta carta para que fique claro para você que sua biópsia estará sendo reestudada. Caso você não deseje participar desta nova pesquisa ficará garantido sua resposta ao Hospital Haroldo Juaçaba – Comitê de Ética em Pesquisa no endereço Rua Papi Jr. 1222, Bairro Rodolfo Teófilo em Fortaleza-CE, no telefone 32884400. Da mesma forma poderá ser encaminhada carta ao pesquisador Dr. Marcio Ribeiro Studart da Fonseca para endereço Av Dom Luis 1233 sala 1210- Bairro Meireles em Fortaleza-CE ou informando pelo telefone 85-34866469 no horário comercial. Caso não queira participar desta pesquisa nenhuma retaliação acontecerá contra você e seu tratamento e acompanhamento continuarão normalmente.

Fortaleza, 22 de janeiro de 2014

MARCIO RIBEIRO STUDART DA FONSECA