

**CRIAÇÃO DE *TISSUE ARRAY* DE MELANOMAS
CUTÂNEOS EXTENSIVOS SUPERFICIAIS PARA
ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DE
FATORES LIGADOS À PROLIFERAÇÃO
E APOPTOSE CELULAR**

BIANCA COSTA SOARES DE SÁ

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Mestre
em Ciências.**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Gilles Landman

**São Paulo
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Soares de Sá, Bianca Costa

Criação de “tissue array” de melanomas cutâneos extensivos superficiais para estudo imunoistoquímico de fatores ligados à proliferação e apoptose celular / Bianca Costa Soares de Sá-- São Paulo, 2005.

117p.

Dissertação(mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Gilles Landman

Descritores: 1. MELANOMA. 2. ANÁLISE MICROARRAY. 3. IMUNOHISTOQUÍMICA. 4.PROTEINA p16. 5.CICLINA D1. 6.PROTEINA CDK. 7.PROTEINA DO RETINOBLASTOMA. 8.PROTEINA p53.

À minha família
que são aqueles que me
dedicam verdadeiro amor.

Ao querido
Dr. Fausto João Forin Alonso
(*in memoriam*)
que será sempre um exemplo verdadeiro
de médico, mestre e amigo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr Gilles Landman, por ter guiado os meus passos da melhor maneira e jamais ter deixado de acreditar, estando ao meu lado sempre que preciso.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação recebidos durante toda a minha vida.

Ao meu marido e filhos, pela paciência e compreensão e principalmente por me fazerem esquecer os momentos difíceis através do seu apoio e do seu amor.

Às amigas: Gisele, por ter aberto os caminhos para o início deste trabalho, e Adriana, por ter me ajudado de maneira imprescindível em sua reta final.

Ao corpo docente da Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente pela excelência na elaboração dos cursos e ensino dos alunos.

Ao Dr Luiz Fernando Lima Reis, Diretor da Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente, por ter a mente e o coração sempre abertos e desta forma exercer o seu cargo da melhor maneira possível.

Aos colegas de trabalho do Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital do Câncer de São Paulo pelo incentivo, auxílio e compreensão durante este período.

Aos funcionários do Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital do Câncer de São Paulo pela constante disposição em ajudar.

A todos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de São Paulo por terem me auxiliado e me acolhido sem restrições.

Aos funcionários do arquivo de blocos e laboratórios do Departamento de Anatomia Patológica, por todo trabalho realizado neste projeto.

Ao Sr. Carlos Eugênio Nascimento Braga, funcionário do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de São Paulo, pelo excelente trabalho na confecção do *tissue microarray*.

À Sueli Nonogaki, funcionária do Centro de Pesquisas do Instituto Ludwig, pela realização das reações imunoistoquímicas com extrema qualidade.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital do Câncer de São Paulo pela ajuda na análise e seleção dos prontuários.

A todas as funcionárias da Biblioteca da Fundação Antônio Prudente, pela sua prestatividade e auxílio nos levantamentos e revisão bibliográfica.

À Suely Francisco, Bibliotecária Chefe, pela formatação deste trabalho e pelo constante incentivo.

À Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari, coordenadora da Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente, e Márcia Miwa Hiratani, funcionária da pós-graduação, pela compreensão, paciência e carinho que me dedicaram durante todo o curso, além de sua eficiência em seus trabalhos.

À Dra Karina de Cássia Braga Ribeiro, pelos ensinamentos na área de bioestatística e pelo auxílio na análise estatística dos dados.

Aos Membros da Banca de Qualificação, Dr. Roger Chammas, Dra Mirian Nacagami Sotto e Dra Mariângela Esther Alencar Marques, pela colaboração e por todas as sugestões que tanto auxiliaram à execução deste projeto.

Ao Dante Simionatto Neto, aluno do PIBIC da Fundação Antônio Prudente, pelo auxílio na coleta de dados e material para a confecção do *tissue microarray*.

À Melissa Fugimori, aluna do PIBIC da Fundação Antônio Prudente, pelo auxílio na avaliação da expressão de ciclina D1.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro (projeto 02/13540.9).

RESUMO

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

Introdução. O melanoma cutâneo é a neoplasia de maior aumento anual em incidência nas populações de pele clara, sendo refratário às terapêuticas atuais quando ocorrem metástases. Esta neoplasia origina-se da transformação maligna de melanócitos epidérmicos, processo multifatorial que envolve as vias de controle do ciclo celular e morte celular programada, como as vias p16/pRb e p53. A técnica de *tissue microarray* permite a avaliação de diversas amostras teciduais simultaneamente, além da análise de grande variedade de marcadores biológicos em um mesmo experimento. Um estudo combinando a análise da expressão de fatores de proliferação celular e apoptose e a utilização da técnica de *tissue microarray*, seria de grande utilidade para o entendimento da iniciação e progressão do melanoma cutâneo. **Objetivo.** Estudar a expressão de proteínas relacionadas à proliferação celular e apoptose em pacientes portadores de melanomas extensivos superficiais *in situ* e invasivos e relacionar a expressão destes fatores ao comportamento biológico tumoral e localização das possíveis metástases. **Pacientes e métodos.** Estudo retrospectivo incluindo 136 pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo do tipo extensivo superficial realizado no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A C Camargo, cujos blocos de parafina do tumor primário e metastático estavam disponíveis nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica. Os melanomas *in situ* e com espessura até 1,0 mm foram analisados através de cortes convencionais, totalizando 64 amostras. Os melanomas acima de 1,0 mm foram estudados através da técnica de

tissue microarray que incluiu 72 amostras de tumores primários e 29 amostras de tumores metastáticos, em duplicata. Foi estudada por imunoistoquímica, através da técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase, a expressão das proteínas p16, ciclina D1, Cdk4, pRb, p53 e p21.

Resultados. Todos os melanomas acima de 1,0 mm perderam a expressão de p16. Nos melanomas *in situ* e finos a sua expressão foi muito baixa. Os melanomas com espessura até 1,0 mm apresentaram maior expressão de ciclina D1 e Cdk4 citoplasmática. Os melanomas com espessura acima de 1,0 mm apresentaram maior expressão de Cdk4 nuclear, p53 e p21. A expressão de pRb não mostrou associação com a espessura do tumor. As variáveis ulceração e regressão não mostraram associação com a expressão das proteínas estudadas. Os melanomas com IM ≥ 1 apresentaram menor expressão de ciclina D1. Os casos com IM > 6 apresentaram maior expressão de p53. Os tumores primários mostraram maior expressão de Cdk4 citoplasmática em relação aos tumores metastáticos. As metástases cutâneas apresentaram maior expressão de p21 em relação ao grupo de metástases não cutâneas. A expressão das proteínas estudadas não mostrou impacto na sobrevida global ou livre de doença dos pacientes.

Conclusões. A perda de expressão de p16 representou uma característica constante nos melanomas estudados. A expressão de ciclina D1 pode estar relacionada às fases iniciais de transformação maligna dos melanócitos. Os melanomas menos espessos expressariam em maior quantidade a proteína Cdk4 citoplasmática e com a aquisição de outras mutações nos melanomas mais avançados, haveria ganho de expressão nuclear. A alteração na expressão da proteína pRb parece ter pouca influência no comportamento biológico e na gênese dos melanomas cutâneos. A alteração da proteína p53 pode representar evento tardio na gênese dos melanomas. A expressão aumentada de p21 pode estar relacionada a mecanismo de *feedback* para o controle da proliferação celular nas células que deixam de expressar p16 ou incrementam a expressão de Cdk4 nuclear.

SUMMARY

Soares de Sá BC. [Superficial spreading cutaneous melanoma tissue microarray: evaluation of cell cycle and apoptosis proteins by immunohistochemistry]. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Background. The incidence of cutaneous melanoma has the highest rate of annual growth in caucasian population and allows very few therapeutic options once metastatic. Malignant transformation of epidermal melanocytes is a multifactorial process involving cell cycle and death control pathways, such as p16/pRb and p53. The tissue microarray technique allows evaluating simultaneously numerous tissue samples for a great variety of biological markers. Therefore, with this technique, it would be of great value to analyse the cell cycle and apoptosis proteins in understanding the initiation and progression of cutaneous melanoma. **Objective:** To analyse the expression of cell cycle and apoptosis proteins in samples of cutaneous *in situ* and invasive superficial spreading melanoma aiming to evaluate and establish the correlation with the biological behavior and site of metastases. **Patients e methods.** A retrospective study of 136 patients with cutaneous superficial spreading melanoma, diagnosed and treated at the Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A C Camargo. Parafin blocks of primary and metastatic tumors were obtained in the files of the Departament of Anatomic Pathology. A total of 64 samples of *in situ* and less than or equal to 1,0 mm melanomas were analysed in conventional sections. Melanomas over 1,0 mm were evaluated in the tissue microarray, including 72 samples of primary and 29 from metastatic tumors. Two samples of each parafin blocks were included. The sections were stained with antibodies against p16, cyclin D1, Cdk4, pRb, p53 and p21 with streptavidine-biotin-peroxidase technique for immunohistochemistry. **Results.** Melanomas above 1,0 mm lost p16

expression whereas *in situ* and thin melanomas had low rate of expression. On the other hand the latter showed higher expression of Cyclin D1 and cytoplasmatic Cdk4. Thick melanomas had increased expression of nuclear Cdk4, p53 and p21. No relationship to thickness has been found for pRb. Ulceration and regression had no association with any of the studied proteins. Melanomas with MR ≥ 1 had lower cyclin D1 expression, whereas p53 had higher expression in melanomas with MR > 6 . Primary tumors, when compared to metastases had higher cytoplasmatic Cdk4 expression. Cutaneous compared to non cutaneous metastases had higher p21 expression. None of the studied proteins had influence in overall or disease-free survival. **Conclusions.** Our results allow concluding that loss of p16 expression was a constant feature in these series. Cyclin D1 could be related to initial phases of the malignant transformation. Thin melanomas would have higher expression of cytoplasmatic Cdk4 whereas thick melanomas acquiring other mutations would gain nuclear expression of this protein. Little influence on biological behavior and pathogenesis of cutaneous melanoma appears to be related to pRb, whereas overexpression p53 may be a late phenomenon. An increase in p21 could represent a cell cycle feedback control for cells that lack or lose p16 and/or increase nuclear Cdk4 expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Demonstração da comparação entre a expressão nuclear do marcador no tumor e o controle negativo BSA.	25
Figura 2	Demonstração da comparação entre a expressão nuclear do marcador no tumor e o controle negativo BSA.	26
Figura 3	Expressão nuclear de p16.	33
Figura 4	Expressão nuclear de ciclina D1.	35
Figura 5	Expressão nuclear e citoplasmática de Cdk4.	38
Figura 6	Expressão nuclear e citoplasmática de Cdk4.	39
Figura 7	Expressão nuclear e citoplasmática de Cdk4.	40
Figura 8	Expressão nuclear de pRb.	42
Figura 9	Expressão nuclear de pRb.	43
Figura 10	Expressão nuclear de pRb.	44
Figura 11	Expressão nuclear de p53.	46
Figura 12	Expressão nuclear de p53.	47
Figura 13	Expressão nuclear de p53.	48
Figura 14	Expressão nuclear de p21.	50
Figura 15	Expressão nuclear de p21.	51
Figura 16	Curvas de sobrevida dos 116 pacientes com melanoma invasivo.	78
Figura 17	Curvas de sobrevida dos 116 pacientes com melanoma invasivo, segundo idade.	78
Figura 18	Curvas de sobrevida dos 116 pacientes com melanoma invasivo, segundo espessura do tumor.	79
Figura 19	Curvas de sobrevida dos 116 pacientes com melanoma invasivo, segundo presença de ulceração.	80
Figura 20	Curvas de sobrevida dos 116 pacientes com melanoma invasivo, segundo o índice mitótico (IM).	81

Figura 21	Curvas de sobrevida dos pacientes com melanoma invasivo, segundo expressão de p16.	82
Figura 22	Curvas de sobrevida dos pacientes com melanoma invasivo, segundo expressão de ciclina D1.	83
Figura 23	Curvas de sobrevida dos pacientes com melanoma invasivo, segundo expressão de Cdk4.	84
Figura 24	Curvas de sobrevida dos pacientes com melanoma invasivo, segundo expressão de pRb.	85
Figura 25	Curvas de sobrevida dos pacientes com melanoma invasivo, segundo expressão de p53.	86
Figura 26	Curvas de sobrevida dos pacientes com melanoma invasivo, segundo expressão de p21.	87
Figura 27	Análise da expressão das vias p16/pRb e p53 em melanomas <i>in situ</i> e finos.	103
Figura 28	Análise da expressão das vias p16/pRb e p53 em melanomas Espessos.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos 136 pacientes com melanoma extensivo superficial, de acordo com a espessura do tumor.	19
Tabela 2	Distribuição dos pacientes com melanoma cutâneo extensivo superficial de acordo com o estadiamento ao diagnóstico segundo o <i>AJCC</i> 2002.	31
Tabela 3	Distribuição dos 162 casos analisados de acordo com a positividade e negatividade nuclear para p16.	32
Tabela 4	Distribuição dos 162 casos analisados de acordo com a positividade e negatividade nuclear para ciclina D1.	34
Tabela 5	Distribuição dos 161 casos analisados de acordo com a positividade e negatividade nuclear e citoplasmática para Cdk4.	37
Tabela 6	Distribuição dos 161 casos analisados de acordo com a positividade e negatividade nuclear para pRb.	41
Tabela 7	Distribuição dos 162 casos analisados de acordo com a positividade e negatividade nuclear para p53.	45
Tabela 8	Distribuição dos 165 casos analisados de acordo com a positividade e negatividade nuclear para p21.	49
Tabela 9	Distribuição dos 125 casos de melanomas primários analisados de acordo com a positividade para p16 e espessura do tumor.	53
Tabela 10	Distribuição dos 125 casos de melanomas primários analisados de acordo com a positividade para ciclina D1 e espessura do tumor.	53
Tabela 11	Distribuição dos 124 casos de melanomas primários analisados de acordo com a positividade nuclear para Cdk4 e espessura do tumor.	54
Tabela 12	Distribuição dos 124 casos de melanomas primários analisados de acordo com a positividade citoplasmática para Cdk4 e espessura do tumor.	54

Tabela 13	Distribuição dos 124 casos de melanomas primários analisados de acordo com a positividade para pRb e espessura do tumor.	55
Tabela 14	Distribuição dos 125 casos de melanomas primários analisados de acordo com a positividade para p53 e espessura do tumor.	56
Tabela 15	Distribuição dos 128 casos de melanomas primários analisados de acordo com a positividade para p21 e espessura do tumor.	56
Tabela 16	Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p16 e presença de ulceração.	57
Tabela 17	Distribuição dos 107 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para ciclina D1 e presença de ulceração.	58
Tabela 18	Distribuição dos 104 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade nuclear para Cdk4 e presença de ulceração.	59
Tabela 19	Distribuição dos 104 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade citoplasmática para Cdk4 e presença de ulceração.	59
Tabela 20	Distribuição dos 105 casos de melanomas primários Invasivos analisados de acordo com a positividade para pRb e presença de ulceração.	60
Tabela 21	Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p53 e presença de ulceração.	60
Tabela 22	Distribuição dos 108 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p21 e presença de ulceração.	61
Tabela 23	Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p16 e presença de regressão.	62

Tabela 24	Distribuição dos 107 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para ciclina D1 e presença de regressão.	62
Tabela 25	Distribuição dos 104 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade nuclear para Cdk4 e presença de regressão.	63
Tabela 26	Distribuição dos 104 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade citoplasmática para Cdk4 e presença de regressão.	63
Tabela 27	Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para pRb e presença de regressão.	64
Tabela 28	Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p53 e presença de regressão.	65
Tabela 29	Distribuição dos 108 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p21 e presença de regressão.	65
Tabela 30	Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p16 e índice mitótico (IM).	67
Tabela 31	Distribuição dos 107 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para ciclina D1 e índice mitótico (IM).	68
Tabela 32	Distribuição dos 107 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para ciclina D1 e índice mitótico (IM) negativo ou positivo.	68
Tabela 33	Distribuição dos 104 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade nuclear para Cdk4 e índice mitótico (IM).	69
Tabela 34	Distribuição dos 104 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade citoplasmática para Cdk4 e índice mitótico (IM).	69

Tabela 35	Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para pRb e índice mitótico (IM).	70
Tabela 36	Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p53 e índice mitótico (IM).	71
Tabela 37	Distribuição dos 108 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p21 e índice mitótico (IM).	71
Tabela 38	Distribuição dos melanomas primários e metastáticos de acordo com a expressão de p16.	72
Tabela 39	Distribuição dos melanomas primários e metastáticos de acordo com a expressão de ciclina D1.	73
Tabela 40	Distribuição dos melanomas primários e metastáticos de acordo com a expressão nuclear de Cdk4.	74
Tabela 41	Distribuição dos melanomas primários e metastáticos de acordo com a expressão citoplasmática de Cdk4.	74
Tabela 42	Distribuição dos melanomas primários e metastáticos de acordo com a expressão de pRb.	75
Tabela 43	Distribuição dos melanomas primários e metastáticos de acordo com a expressão de p53.	76
Tabela 44	Distribuição dos grupos de tumores metastáticos de acordo com a expressão de p21.	77
Tabela 45	Distribuição dos melanomas primários e metastáticos de acordo com a expressão de p21.	77

LISTA DE ABREVISTURAS

Cdk	Quinase dependente de Ciclina (do inglês <i>Cyclin-dependent Kinase</i>)
IM	Índice mitótico
MR	Mitotic rate
pRb	proteína do retinoblastoma
TMA	<i>Tissue microarray</i>
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (do inglês <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>)

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	PACIENTES E MÉTODOS	14
3.1	Pacientes	14
3.1.1	Critérios de inclusão	14
3.2	Análise histológica	15
3.3	Casuística	19
3.4	Confecção do <i>tissue microarray</i>	20
3.5	Estudo imunoistoquímico	21
3.5.1	Protocolo de reações	22
3.5.2	Leitura das lâminas	23
3.6	Análise estatística	28
4	RESULTADOS	30
4.1	Estatística descritiva	30
4.2	Estudo da associação entre a expressão dos marcadores biológicos e espessura do tumor	52
4.3	Estudo da associação entre a expressão dos marcadores biológicos e ulceração	57
4.4	Estudo da associação entre a expressão dos marcadores biológicos e regressão	61
4.5	Estudo da associação entre a expressão dos marcadores biológicos e índice mitótico	66
4.6	Tumor metastático	72
4.7	Sobrevida global e livre de doença	77

5	DISCUSSÃO	88
6	CONCLUSÕES	104
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

1 INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é uma neoplasia relativamente rara, mas a sua incidência tem se mantido crescente em várias populações de origem européia, sendo a neoplasia de maior aumento anual em incidência nas populações de pele clara (MACKIE et al. 2002; GERBAUD et al. 2003; KATALINIC et al. 2003; DE VRIES et al. 2003). ARMSTRONG 2004). Acomete indivíduos jovens, sendo refratário às terapêuticas atuais quando ocorrem metástases (SLOMINSKI et al. 1998; SHEN et al. 2003). Corresponde à sexta neoplasia maligna em mulheres e a quinta em homens nos EUA e a segunda encontrada em Queensland, Austrália (Queensland Cancer Registry Health Information Centre Queensland Health Level 1998; JEMAL et al. 2005).

No Brasil, dados do INCA revelam uma incidência global de melanoma variando de zero a 8,73 por 100.000 habitantes, sendo estimados 5820 novos casos para o ano 2005, com a maior taxa de incidência no Estado de Santa Catarina (Ministério da Saúde 2004).

O melanoma cutâneo origina-se da transformação dos melanócitos epidérmicos, cuja principal função é a produção da melanina, pigmento que confere fotoproteção à pele (GREEN e KHAVARI 2004; RIZOS et al. 2004). Os melanócitos epidérmicos também atuam como células sensoriais e regulatórias através da indução de respostas neuroendócrinas e imunomodulatórias, participando, deste modo, da manutenção da

homeostase cutânea (SLOMINSKI et al. 1998). Os melanócitos humanos, na idade adulta, estão normalmente quiescentes e podem apresentar atividade mitótica discreta com a ação de estímulos externos específicos como radiação ultravioleta e cicatrização (SLOMINSKI et al. 1998; RIZOS et al. 2004). Esta atividade proliferativa específica requer controle delicado do ciclo celular e alterações em seus sinais regulatórios podem resultar em divisão celular não controlada, podendo representar o início de processo de transformação maligna (RIZOS et al. 2004). O processo de transformação maligna dos melanócitos é provavelmente multifatorial e resulta de interações complexas entre fatores genéticos, constitucionais e ambientais (ALBINO et al. 1997; SLOMINSKI et al. 2001; SULAIMON e KITCHELL 2003).

O melanoma cutâneo é uma neoplasia que permite o estudo de eventos celulares relevantes para a transformação maligna, pois sua história natural mostra estágios progressivos de agressividade do tumor, de acordo com a sua capacidade de infiltrar a derme (PARMITER e NOWELL 1993; REED et al. 1995; SU e TRENT 1995; ROBERTSON et al. 1996; ALBINO et al. 1997; KIM et al. 2002). Esta característica do tumor baseia-se no fato de que a transição do padrão de crescimento radial para o padrão de crescimento vertical, com infiltração da derme, é um marco de grande importância em várias das propriedades biológicas do tumor, incluindo sua capacidade de metastatização (ROBERTSON et al. 1996).

Assim como na maioria das neoplasias malignas em humanos, o desenvolvimento do melanoma cutâneo resulta do rompimento da

integridade do genoma dos melanócitos que induz instabilidade sustentada, produzida por alterações cromossômicas, que irão determinar as características neoplásicas destas células (PARMITER e NOWELL 1993; ROBERTSON et al. 1996; ALBINO et al. 1997). A tumorigênese envolve alterações dinâmicas do genoma produzidas por mutações que determinam ganho de função de oncogenes ou perda de função de genes supressores de tumor (HANAHAHAN e WEINBERG 2000). Este processo ocorre em etapas, determinando a transformação progressiva da célula normal em célula neoplásica (HANAHAHAN e WEINBERG 2000).

Numerosos são os estudos em busca de anormalidades cromossômicas relacionadas ao melanoma, muitas das quais envolvendo *locus* gênicos relacionados a fatores de proliferação ou de apoptose, já que alterações na expressão ou atividade das proteínas que regulam o ciclo celular e a morte celular programada são essenciais para o aparecimento das neoplasias e sua capacidade de metastatização (HANAHAHAN e WEINBERG 2000; CZAJKOWSKI et al. 2002; KIM et al. 2002; RANE et al. 2002; BURY e CROSS 2003). Os princípios básicos da regulação do ciclo celular estão na iniciação de reações em cascata que irão culminar na fosforilação e desfosforilação de proteínas relevantes. Na fase G1 do ciclo celular estas reações são controladas através das vias das proteínas pRb e p53 (CZAJKOWSKI et al. 2002).

O gene CDKN2A, localizado no cromossomo 9p21, é um gene supressor de tumor de grande interesse no estudo dos melanomas cutâneos. A presença de deleções, mutações ou rearranjos deste gene,

tanto em melanomas familiares quanto em melanomas esporádicos, foi descrita em diversos estudos (OHTA et al. 1994; HOLLAND et al. 1995; REED et al. 1995; SU e TRENT 1995; FLORES et al. 1996; OHTA et al. 1996; ALBINO et al. 1997; MANGINI et al. 2002; BENNETT 2003; GREEN e KHAVARI 2003; SVIDERSKAYA et al. 2003). O gene CDKN2A possui papel crucial na regulação do ciclo celular e processos de senescência da célula (BATAILLE 2003). Este gene codifica duas proteínas distintas através de processamento alternativo e tradução dos produtos em janelas de leitura diferentes: a proteína p16 e a proteína 14^{ARF} (*Alternative Reading Frame*), ambas atuando no controle do ciclo celular e apoptose, sendo a p16 através da proteína do retinoblastoma (pRb) e a p14 via proteína p53 (BATAILLE 2003; HAYWARD 2003). A proteína p16, em células normais, liga-se às quinases dependentes de ciclina (CDKs) 4 e 6, inibindo a formação do complexo CDK-ciclina D e subsequentemente evitando a fosforilação de pRb, o que resulta na parada do ciclo celular. A pRb na sua forma não fosforilada inibe a passagem da célula da fase G1 para a fase S do ciclo celular. A fosforilação de pRb pelo complexo CDK-ciclina D leva à liberação do fator de transcrição E2F que é necessário para que a célula entre na fase S e inicie a replicação de DNA. O desequilíbrio deste processo produz crescimento celular descontrolado e desenvolvimento tumoral. Desta forma, a proteína p16 é considerada um regulador negativo do ciclo celular atuando no ponto de checagem G1 (GRANA e REDDY 1995; ELLEDGE 1996; SHERR e ROBERTS 1999; BATAILLE 2003; BURY e CROSS 2003; SVIDERSKAYA et al. 2003; RIZOS et al. 2004; ZHANG e ROSDAHL 2004).

A perda de expressão da proteína p16 em melanomas está associada à capacidade de invasão e metastização, além de recorrência do tumor e pior prognóstico (HOLLAND et al. 1995; REED et al. 1995; OHTA et al. 1996; SLOMINSKI et al. 1998; MANGINI et al. 2002; ZHANG e ROSDAHL 2004). Demonstrou-se, também, que a proteína p16 é necessária para a senescência dos melanócitos normais e a falta da sua expressão contribuiria para a imortalização de células portadoras de mutações no gene CDKN2A (SVIDERSKAYA et al. 2003). A via p16/ciclina D1/Cdk4/pRb é um alvo freqüente na patogênese do melanoma e alguns estudos mostram que em células de melanoma, pelo menos um de seus componentes apresenta função alterada (BARTKOVA et al. 1996; MAELANDSMO et al. 1996a).

A ciclina D1 é codificada pelo gene CCND1, localizado no cromossomo 11q13. A superexpressão de ciclina D1 está relacionada a aparecimento precoce de câncer e risco de progressão tumoral e desenvolvimento de metástases (FU et al. 2004). A amplificação e ou superexpressão do gene CCND1 é um evento relativamente precoce no processo de tumorigênese, ocorrendo em 15 a 50% dos tumores primários de mama (SAUTER et al. 2002; FU et al. 2004). Altos níveis de ciclina D1 foram encontrados em nevos displásicos e em células de melanomas esporádicos (CZAJKOWSKI et al. 2002). A expressão aumentada de ciclina D1 pode resultar de amplificação gênica ou ativação de via acessória através de mutação do gene codificador da proteína *Ras* (FILMUS et al. 1994; CZAJKOWSKI et al. 2002; SAUTER et al. 2002; FU et al. 2004). Independentemente do mecanismo de superexpressão da ciclina D1, alguns

estudos sugerem que a determinação da atividade desta proteína em lesões pigmentadas pode auxiliar na diferenciação entre melanoma maligno e nevos comuns (CZAJKOWSKI et al. 2002). Porém, o papel desta proteína no desenvolvimento dos melanomas ainda não está determinado (SAUTER et al. 2002).

O gene Cdk4 está localizado no cromossomo 12q13-14 e apresenta-se freqüentemente amplificado e ou superexpresso em diferentes tipos de neoplasias como sarcomas e glioblastomas (MAELANDSMO et al. 1996a). Em melanomas esporádicos, alguns casos mostraram superexpressão deste oncogene (CZAJKOWSKI et al. 2002). Alguns estudos evidenciaram altos níveis de Cdk4 RNA mensageiro em melanomas, geralmente acompanhados de alta expressão de ciclina D1 (MAELANDSMO et al. 1996a). É descrita, ainda mutação *missense* no gene Cdk4, em melanomas e linhagens celulares deste tumor, que leva à troca de arginina por cisteína no códon 24, tornando a proteína resistente à inibição por p16 e potencializando-o como oncogene (BARTKOVA et al. 1996).

A proteína pRb é codificada pelo gene RB1, localizado no cromossomo 13q14, e a inativação de ambos alelos determina o aparecimento do retinoblastoma. Pacientes com retinoblastoma e seus parentes têm maior freqüência de nevos atípicos e risco aumentado de melanoma (BARTKOVA et al. 1996). A incidência de melanoma em familiares de pacientes com retinoblastoma familiar é maior do que nos casos esporádicos (BARTKOVA et al. 1996). A inativação deste gene pode ocorrer por mutações somáticas em osteossarcomas e carcinomas de pequenas

células (MAELANDSMO et al. 1996a). A perda de expressão da proteína pRb apresenta maior impacto no controle da proliferação celular do qualquer outra proteína desta via (BARTKOVA et al. 1996). A inativação do gene RB parece ser um evento raro no desenvolvimento do melanoma, pois vários estudos mostram que a expressão da pRb está inalterada na maioria destes tumores (PIEPKORN 2000). Em 2001, KORABIOWSKA et al. mostraram correlação entre perda de expressão do gene RB e maior infiltração dos melanomas e menores taxas de sobrevida. Assim sendo, a forma de expressão do gene RB na patogênese do melanoma ainda não está estabelecido.

O gene p53 é um gene supressor de tumor localizado no cromossomo 17p13 cuja mutação é descrita em diversos tumores malignos (PARMITER e NOWELL 1993; MANGINI et al. 2002). Possui função primária de manutenção das células em estado de repouso após qualquer dano no DNA, preservando a estabilidade do genoma da célula (BAE et al. 1996; CZAJKOWSKI et al. 2002; MANGINI et al. 2002). A presença de dano no material genético celular induz a expressão da proteína p53, que irá intensificar a expressão do gene *Cip1*, que codifica a proteína p21. Esta proteína leva à parada do ciclo celular na fase G1, através da sua ligação com o complexo CDK-ciclina (CZAJKOWSKI et al. 2002). A proteína p53 é capaz de induzir apoptose se não houve a devida reparação do DNA danificado, protegendo a célula do acúmulo de mutações e subsequente transformação maligna. (BAE et al. 1996; CZAJKOWSKI et al. 2002; MANGINI et al. 2002). Para a indução de apoptose, a proteína p53 induz a

expressão de proteínas que participam deste processo pela via mitocondrial e via receptor de morte, incluindo Bax, NOXA e PUMA (HUSSEIN et al. 2003; WU et al. 2004). Foi descrita, ainda, a participação de p53 na senescência tardia, dependente de encurtamento de telomerase, em melanócitos com deficiência da proteína p16 (BURY e CROSS 2003; SVIDERSKAYA et al. 2003). Em melanomas esporádicos, mutações pontuais do gene p53 são raras, ocorrendo em menos de 25% dos casos (CZAJKOWSKI et al. 2002; HUSSEIN et al. 2003). Alterações nos exons 7 e 8, que determinam a atividade da proteína p53, são mais comumente vistas em melanomas nodulares localizados em áreas expostas (CZAJKOWSKI et al. 2002). Apesar de estudos da expressão do gene p53 em melanomas mostrarem resultados controversos, algumas conclusões importantes podem ser definidas: mutações do gene p53 ocorrem em um pequeno número de tumores melanocíticos, em porcentagem menor do que outros tumores cutâneos não melanoma e outras neoplasias internas; estas mutações podem ser vistas em lesões névicas benignas, mas quando ocorrem nos melanomas, são mais comumente encontradas nos tumores metastáticos; o mecanismo das mutações de p53 em melanomas ainda é desconhecido; e para a determinação do valor prognóstico e diagnóstico destas mutações, serão necessários ainda estudos futuros (HUSSEIN et al. 2003).

O gene *waf1/Cip1* localizado no cromossomo 6p21.2 é também um gene supressor de tumor e codifica a proteína p21, sendo um dos principais genes efetores que participam do controle do ciclo celular através da via do p53. A proteína p21 é um potente inibidor de quinases dependentes de

ciclina (CDKs) e impede a replicação do DNA, ligando-se ao complexo CDK-ciclina e evitando a sua ação sobre a proteína Rb (ALBINO et al. 1997; KARJALAINEN et al. 1999). Outra via de ação da proteína p21 é através de sua ligação direta ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), anulando a atividade da enzima DNA polimerase (KARJALAINEN et al. 1999). Alguns estudos mostram que a diminuição da expressão da proteína p21 está associada com progressão do melanoma e fenótipo metastatizante (KARJALAINEN et al. 1999), porém outros estudos revelam que existe uma correlação positiva entre o nível de expressão da proteína 21 e o avanço do estadio da doença (SPARROW et al. 1998; BALES et al. 1999; CZAJKOWSKI et al. 2002). Foi demonstrado que outros sinais podem induzir à expressão do gene *waf1/Cip1*, independentemente de p53 (KARJALAINEN et al. 1999; MANGINI et al. 2002). A expressão do gene *waf1/Cip1* é heterogênea e está relacionada à complexidade da função da proteína p21 na regulação do ciclo celular, que varia de acordo com a sua concentração local (CZAJKOWSKI et al. 2002).

Técnicas para estudo da expressão gênica em melanomas cutâneos

As técnicas de análise de expressão gênica geralmente apresentam contaminação por tecido estromal, em material obtido para estudo de lesões melanocíticas, além da limitação no número de amostras que podem ser estudadas em um único experimento (RUBIN 2001; KIM et al. 2002).

A técnica de microdissecção a laser tem permitido a obtenção de pequeno número de células tumorais não contaminadas por células

estromais (EMMERT-BUCK et al. 1996). Mas esta técnica ainda mantém a limitação no número de amostras a serem estudadas.

A técnica de *tissue microarray* foi descrita em 1998 por KONONEN et al. e permite a avaliação de centenas de amostras teciduais, fixadas em formalina em bloco de parafina, em uma única lâmina (RUBIN 2001; KORABIOWSKA et al. 2004). Este método para análise de expressão gênica é de extrema importância, dada a grande variedade de genes candidatos descobertos através da técnica de *cDNA microarray* (FRANTZ et al. 2001; RUBIN 2001). A técnica de *tissue microarray* baseia-se na análise de amostras de tecidos em blocos de parafina que compõem os arquivos de patologia. Desta forma, grande variedade de tumores, além de amostras numerosas, pode ser estudada (ALIZADEH et al. 2001; LEWIS et al. 2001; KIELHORN et al. 2003; PACIFICO et al. 2005). Mais importante ainda é o fato de que as amostras podem ter sido coletadas há vários anos, permitindo a devida análise de dados em relação ao acompanhamento e evolução clínica dos doadores dos tecidos estudados (ALIZADEH et al. 2001; BUBENDORF et al. 2001; KIELHORN et al. 2003). A técnica de *tissue microarray* baseia-se na obtenção de amostras de blocos de parafina coletadas através de agulha (*punch*) com diâmetro de 0,6; 1,0; 1,5 ou 2,0 milímetros, que são inseridas em um bloco receptor, através de um aparelho chamado *Tissue Microarrayer* (BUBENDORF et al. 2001). Pode-se, assim, coletar até 700 espécimes em cada bloco receptor, com pouca mutilação do bloco de origem. O bloco receptor montado pode prover de 100 a 400 cortes de 5 a 8 micras, que podem ser analisados através de grande variedade de

sondas de DNA, RNA e proteínas (ALIZADEH et al. 2001; BUBENDORF et al. 2001; LEWIS et al. 2001; KORABIOWSKA et al. 2004; PACIFICO et al. 2004). Pode-se, então, realizar, simultaneamente, a análise de DNA, RNA e expressão de proteínas em todos os espécimes em um único experimento e, ainda, analisar centenas de marcadores moleculares no mesmo grupo de espécimes.

Desta forma, é possível criar bancos compreendendo melanomas primários em diferentes estadios e suas possíveis metástases, em localizações diversas, permitindo o estudo de diversas proteínas para a determinação de possíveis marcadores biológicos de prognóstico e resposta terapêutica. Este tem sido o enfoque de diversos estudos em melanomas cutâneos com a utilização da técnica de *tissue microarray* (SAUTER et al. 2002; SHEN et al. 2003; DAI et al. 2003; KIELHORN et al. 2003; ALONSO et al. 2004; KASHANI-SABET et al. 2004; PACIFICO et al. 2005). Porém, em tumores com grande heterogeneidade, como os melanomas, os dados adquiridos através de material de *tissue microarray* poderiam ser questionados em relação à sua verdadeira representatividade do tumor. PACIFICO et al. publicaram em 2004 um estudo validando a técnica de *tissue microarray* para análise imunoistoquímica de melanomas, comparando os dados obtidos através desta técnica com os dados obtidos através de cortes convencionais e sugerem o uso de quatro cores de cada espécime para reduzir as chances de erro.

Um estudo combinando a análise da expressão de fatores de proliferação celular e apoptose e sua participação no comportamento

biológico de grande número de melanomas em estadios diferentes e suas respectivas metástases, seria de grande importância para o entendimento da evolução desta neoplasia, além da possibilidade de identificação de marcadores biológicos de prognóstico e possíveis alvos terapêuticos. Este estudo seria possibilitado pela criação de um *tissue microarray* de espécimes de melanoma cutâneo, incluindo melanomas primários invasivos em fases radial e/ou vertical de crescimento, metástases linfonodais, cutâneas e ou viscerais.

Ao invadirem a derme, os melanomas passam a adquirir capacidade metastatizante. Portanto, o estudo de melanomas *in situ* ou em fase radial de crescimento permitiria avaliar as mudanças de expressão de marcadores de proliferação e apoptose, comparando-os aos melanomas invasivos. No entanto, a escassez de elementos neoplásicos em melanomas *in situ* e em fase radial de crescimento torna difícil a obtenção de quantidade suficiente de tecido para sua inclusão em *tissue microarray*. A melhor técnica para o estudo imunoistoquímico destes melanomas seria através de cortes histológicos convencionais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a expressão de proteínas relacionadas à proliferação celular e apoptose em pacientes portadores de melanomas extensivos superficiais *in situ* e invasivos e relacionar a expressão destes fatores ao comportamento biológico tumoral e localização das metástases, quando presentes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Criação de um banco de dados com pacientes portadores de melanoma cutâneo do tipo extensivo superficial *in situ* e invasivo.
2. Criação de *tissue microarray* para o estudo dos melanomas extensivos superficiais invasivos com espessura maior que 1,0 mm e suas metástases.
3. Estudar por imunoistoquímica a expressão das proteínas p16, ciclina D1, Cdk4, pRb, p53 e p21 nos pacientes que compõem o banco de dados.
4. Relacionar a expressão das proteínas estudadas com fatores prognósticos (espessura do tumor, ulceração, regressão histológica e índice mitótico), sobrevida global e livre de doença e localização das possíveis metástases.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Foram selecionados os casos de melanoma cutâneo do tipo extensivo superficial, diagnosticados no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A C Camargo.

Os prontuários dos pacientes foram revistos para análise de variáveis demográficas, dados clínicos, estadiamento, tratamento, evolução e *status*.

3.1.1 Critérios de Inclusão

1. Pacientes cujo diagnóstico de melanoma extensivo superficial tenha sido realizado no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer e cujos blocos de parafina estavam disponíveis nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica, dispondo de material suficiente para confecção do *tissue microarray*.
2. Nos pacientes em que havia metástases para estudo, foram incluídas aquelas cujos blocos de parafina estavam disponíveis nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica e que dispunham de material suficiente para confecção do *tissue microarray*.
3. Pacientes com pelo menos 2 anos de seguimento clínico encontrado nos prontuários a partir do diagnóstico histopatológico de melanoma cutâneo do tipo extensivo superficial.

3.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Foram revistas todas as lâminas dos tumores primários e metastáticos selecionados, para confirmação diagnóstica e avaliação das variáveis anatomopatológicas de acordo com o protocolo estabelecido pelo Grupo Brasileiro de Melanoma e Sociedade Brasileira de Patologia. Foi dada ênfase aos seguintes parâmetros histológicos:

1. *Profundidade de infiltração segundo Breslow* – Esta medida determina o volume da neoplasia e correlaciona-se diretamente com a profundidade de infiltração do tumor. É expressa em milímetros e determinada a partir da camada granulosa até a célula neoplásica mais profunda encontrada (BRESLOW 1970). A espessura do tumor é considerada o fator prognóstico isolado mais importante nos pacientes com melanoma localizado (estádios I e II) (BALCH et al. 2001a). O limite de 1 mm define os melanomas finos e de bom prognóstico e o estadiamento, determinado pelo *American Joint Committee on Cancer*, define para a categoria T (tumor) os limites de 1.0, 2.0 e 4.0mm (BALCH et al. 2001a e b) (Quadro1).
2. *Ulceração* - é definida como solução de continuidade da epiderme, substituída por tampão fibrino-leucocitário sobre a lesão primária, em decorrência da infiltração neoplásica (BALCH CM et al. 2001b). A ulceração é o segundo fator prognóstico mais importante nos

melanomas localizados (estádios I e II) (BALCH et al. 2001a e b). Nos melanomas em estágio III, é a característica histológica de pior prognóstico do tumor primário (BALCH et al. 2001a e b). Nos melanomas com espessura acima de 1 mm é considerada o fator preditivo mais significativo, representando maior risco de desenvolvimento de metástases (BALCH et al. 2001a e b). A presença de ulceração define os subgrupos da categoria T (tumor) de acordo com o novo estadiamento determinado pelo *American Joint Committee on Cancer* (BALCH et al. 2001a e b) (Quadros 1 e 2)

3. *Regressão histológica* – é definida como uma área, dentro do melanoma, onde há ausência de células neoplásicas na epiderme e na derme, substituídas por tecido fibroso e aumento da vascularização, podendo ser encontrados linfócitos e melanófagos (CLARK et al. 1989). A regressão é encontrada em cerca de 1/3 dos casos de melanoma. Ao contrário do que se esperaria, o encontro de regressão tem sido associado a um pior prognóstico, possivelmente indicando que a neoplasia antes do processo regressivo estaria a uma profundidade maior do que a atualmente encontrada, portanto com evolução mais reservada. Outra explicação possível indica que o sistema imune reconheceria clones selecionados de células neoplásicas, destruindo-os, o que por outro lado selecionaria clones resistentes à resposta imune do hospedeiro (TRAU et al. 1983; CLARK et al. 1989).

4. *Índice mitótico* – é expresso como o número de mitoses em 10 campos de grande aumento (400X) na área invasiva do tumor. A contagem inicia-se na área de maior número de mitoses. O índice mitótico é também considerado um importante fator prognóstico nos pacientes com melanoma e em alguns estudos até com maior significância que a ulceração, mas estes dados ainda são controversos, principalmente pelo uso de diferentes métodos de mensuração nos diversos estudos sobre o tema (AZZOLA et al. 2003; BUSAM 2004; FRANCKEN et al. 2004; BARNHILL et al. 2005; NAGORE et al. 2005). Classificou-se o número de mitoses encontradas em: ausente (0), de 1 a 6 e mais que 6 mitoses por dez campos de grande aumento (400X).

Nos melanomas extensivos superficiais com espessura acima de 1,0 mm e nas lesões metastáticas, as lâminas foram marcadas nas áreas de maior quantidade de células neoplásicas para punção e transporte ao bloco receptor do *tissue microarray*. Foram incluídas 10 lesões de nevo melanocítico composto, como controle, que foram marcadas da mesma forma em suas lâminas, após revisão e confirmação diagnóstica.

T	Espessura	Ulceração
Tis	Melanoma <i>in situ</i>	
T1	≤ 1mm	a: sem ulceração e Clark II/III b: com ulceração ou Clark IV/V
T2	1,01 - 2mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T3	2,01 – 4mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T4	> 4mm	a: sem ulceração b: com ulceração
N	Nº de linfonodos metastáticos	Infiltração tumoral do linfonodo
N1	1 linfonodo	a: micrometástase* b: macrometástase*
N2	2 ou 3 linfonodos	a: micrometástase* b: macrometástase* c: metástases em trânsito/satelitose sem metástase nodal
N3	4 linfonodos ou mais, ou linfonodos confluentes, ou metástases em trânsito/satelitose com metástase linfonodal	
M	Localização	DHL sérico
M1a	Metástase cutânea, subcutânea ou linfonodal à distância	Normal
M1b	Metástase pulmonar	Normal
M1c	Outras metástases viscerais	Normal
	Qualquer metástase à distância	Elevada

* Micrometástases são diagnosticadas após realização de pesquisa do linfonodo sentinela ou linfadenectomia.

* Macrometástases são definidas como linfonodos clinicamente detectados e confirmados por linfadenectomia terapêutica ou quando as metástases linfonodais apresentarem infiltração extra-capsular.

Fonte: Adaptado de BALCH et al. (2001b)

Quadro 1 - Classificação TNM do Melanoma, segundo *American Joint Committee on Cancer*, 2002.

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
IIA	T2a	N0	M0
	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	Qualquer T	N1	M0
IIIB	Qualquer T	N2a ou N2b ou N3	M0
IIIC	Qualquer T	N2c	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	Qualquer M

Fonte: Adaptado de BALCH et al. (2001b)

Quadro 2 - Estadiamento clínico do Melanoma, segundo *American Joint Committee on Cancer*, 2002.

3.3 CASUÍSTICA

Em estudo retrospectivo, foram analisados prontuários de 1994 a 2000 e selecionados 136 pacientes de acordo com os critérios de inclusão, como mostra a Tabela 1. Os melanomas invasivos com espessura menor ou igual a 1,0 mm são chamados de melanomas finos.

Tabela 1 - Distribuição dos 136 pacientes com melanoma extensivo superficial, de acordo com a espessura do tumor.

Espessura do tumor (mm)	Número de pacientes
<i>In situ</i>	20
≤ 1,0	44
1,01 – 2,0	31
2,01 – 4,0	25
> 4,0	16
TOTAL	136

3.4 CONFECCÃO DO *TISSUE MICROARRAY*

Para a confecção do *tissue microarray* (TMA) foi utilizada aparelhagem disponível no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer – *tissue microarrayer* (Beecher Instrunents ®, Silver Spring, EUA). A área identificada no bloco doador foi puncionada em 2 locais diferentes (selecionados previamente) com agulha de 1mm e os cilindros obtidos foram transferidos para o bloco receptor. Foram incluídas 111 amostras em duplicata, totalizando 222 amostras no TMA. As 111 amostras incluíam 72 tumores primários (melanomas extensivos superficiais acima de 1 mm) , 29 tumores metastáticos (13 metástases cutâneas, 8 linfonodais e 8 pulmonares) e 10 nevos compostos. Todas as metástases cutâneas e linfonodais e um caso de metástase pulmonar têm melanoma primário incluído no TMA. As sete amostras restantes foram incluídas para possibilitar a análise comparativa de expressão das proteínas estudadas entre os diferentes grupos de tumor metastático.

Confeccionou-se 100 lâminas a partir do bloco receptor, em cortes seqüenciais de 6 µm. As lâminas 01, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 foram coradas com Hematoxilina e Eosina para controle do material incluído. Através de mapa construído em planilha Excel®, com identificação detalhada de cada cilindro, é possível a localização precisa de cada caso no bloco e lâminas do TMA.

3.5 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

Estudaram-se os seguintes marcadores biológicos em lâminas obtidas de TMA de melanomas extensivo superficiais invasivos com espessura maior que 1,0 mm e metástases, e em cortes histológicos convencionais de melanomas *in situ* e melanomas extensivos superficiais finos:

1. Anti p16^{ink4a} - clone DCS-50 1/h4 Oncogene cat NA29, na diluição de 1/40
2. Anti-ciclina D1 – mouse anti-human - clone DCS-6 Dako cat. M7155, na diluição de 1/300
3. Anti-Cdk4 - mouse anti-human - Santa Cruz – cat. SC-260, na diluição de 1/100
4. Anti pRb - Anticorpo mouse anti-human clone Rb1 M7131 – Dako, na diluição de 1/50
5. Anti p53 – clone D07, DAKO, código m7001, na diluição de 1/100
6. Anti-p21^{waf-1}(Ab-1), clone EA10 – Oncogene cat 0p64T, na diluição de 1/30.

Para cada anticorpo foram selecionadas 2 lâminas de TMA, distantes entre si pelo menos 10 cortes (aproximadamente 60 micras) e 1 lâmina para cada caso a ser estudado em cortes convencionais. Então, para cada caso incluído no TMA, estudou-se 2 amostras em duplicata em níveis diferentes.

3.5.1 Protocolo de Reações

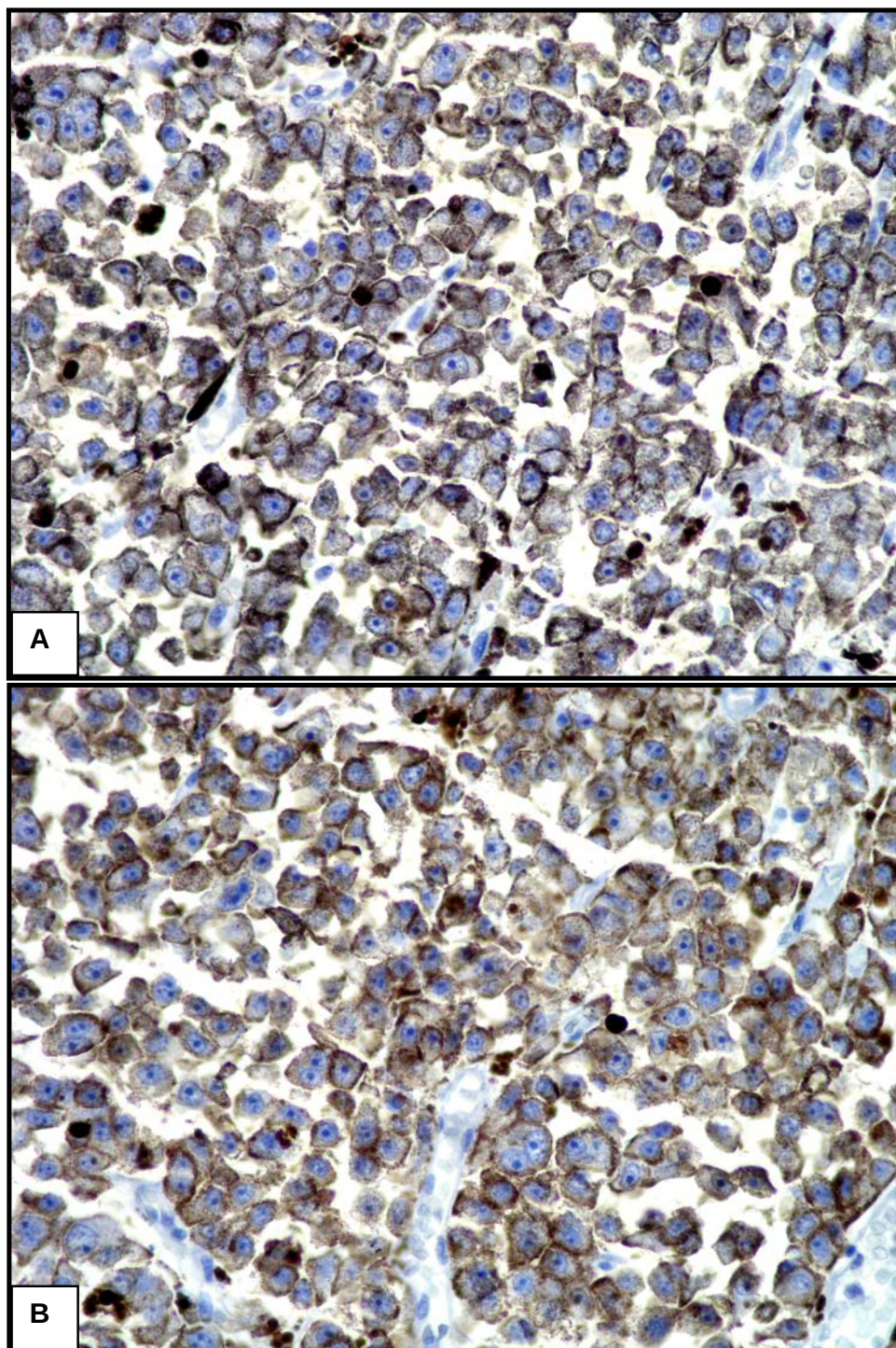
As lâminas foram previamente tratadas com 3-aminopropiltrietoxi-silano (Sigma, A-3648, USA) e deixadas por 24 horas em estufa a 60°C. Foram submetidas a desparafinização em xilol a 60°C por 20 minutos e então xilol à temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente foi realizada a preparação das lâminas através de passagens sucessivas em etanol a cada 30 segundos (100%, 95% e 70%) e então lavagem em água corrente. As lâminas foram então submetidas à recuperação antigênica pelo calor, utilizando-se panela de pressão (Eterna® , Nigro) e solução tampão citrato 10 mM pH 6,0. A seguir, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol.), com quatro trocas de 5 minutos cada, seguida de lavagens com solução salina tamponada com fosfatos (PBS - *phosphate buffered saline* – 10 mM e pH 7,2) por 5 minutos. Incubaram-se as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, em tampão PBS, contendo albumina bovina (BSA) a 1% (SIGMA, A9647, USA) e azida sódica (NaN₃) a 0,1%, por 18 horas, a 4°C, em câmara úmida. Após a incubação, lavaram-se as lâminas em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada. Iniciou-se, então, a incubação das lâminas com o anticorpo secundário biotinilado-reagente C (Biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig) do kit StreptABComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (Dako A/S, K492, Denmark) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C e posterior lavagem em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada. Incubou-se, então, o complexo reagente A (Streptavidin) no título pré-

estabelecido de 1:200 e reagente B (Biotinylated Peroxydase) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C e posterior lavagem em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada. As lâminas foram então incubadas em solução substrato 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 60mg%(Sigma, D-5637 USA), 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 1mL de água oxigenada 6%, 100mL de PBS, por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Após a observação do desenvolvimento do precipitado castanho, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por 3 minutos e contracoradas com Hematoxilina de Harris (Merek) por 1 minuto. Seguiu-se, então, a desidratação das lâminas em etanol e xilol e subsequente montagem das mesmas para a leitura. As reações foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado, e controle negativo, realizado pela omissão do anticorpo primário.

3.5.2 Leitura das Lâminas

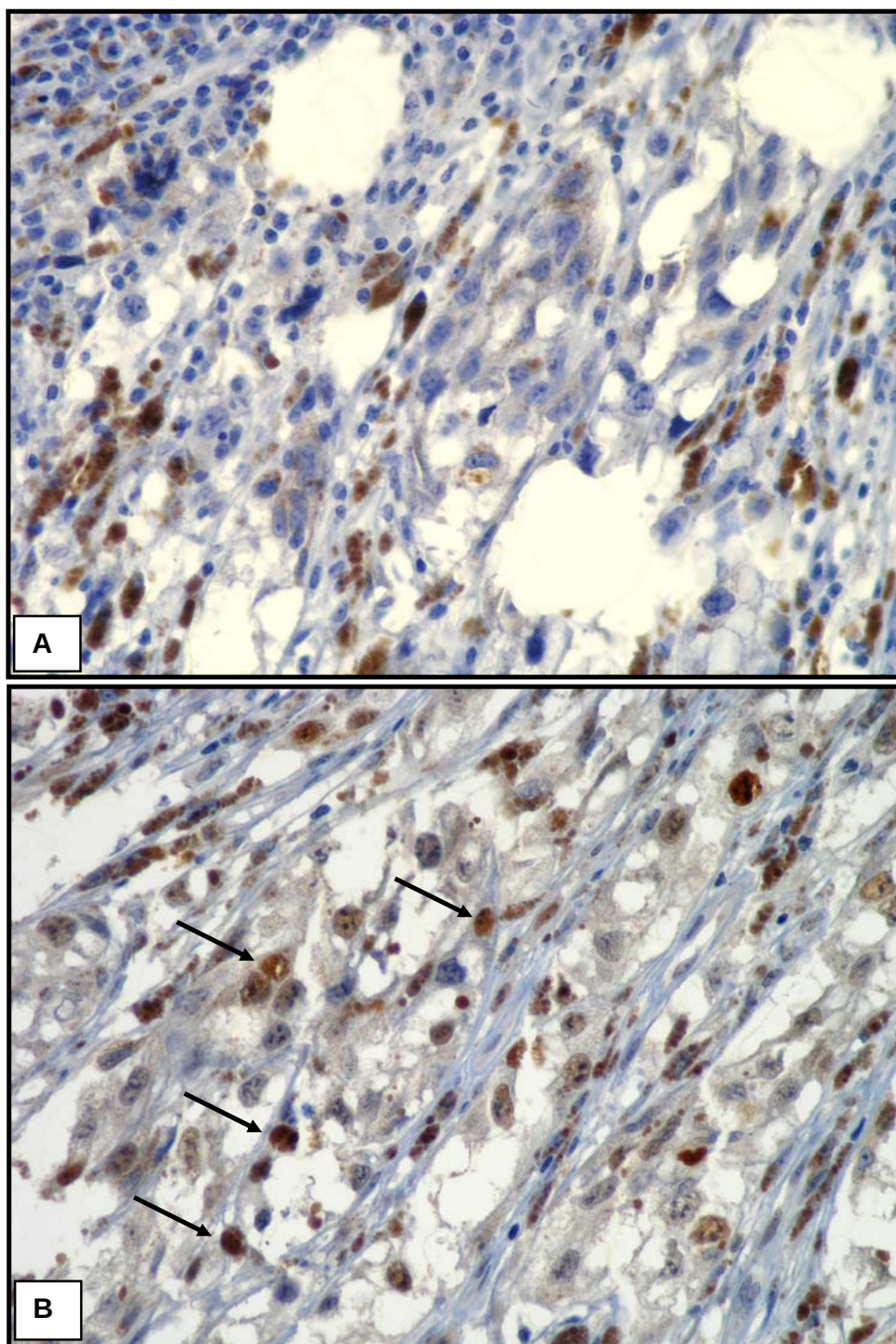
A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum. Para os espécimes incluídos no TMA, avaliou-se quatro amostras de cada caso. Considerou-se representativa a amostra que contivesse neoplasia (ou nevo) em pelo menos 25% do cilindro e expressou-se o resultado final como a média das contagens daquelas consideradas representativas. Para todos os anticorpos estudados considerou-se a marcação nuclear. Na análise de Cdk4, considerou-se também a marcação citoplasmática. Para os casos que apresentavam grande quantidade de melanina, utilizou-se lâminas

comparativas do mesmo corte, onde na reação imunoistoquímica foi omitido o anticorpo primário, caracterizando um controle negativo chamado de BSA (Figuras 1 e 2).



Legenda: **A)** controle negativo BSA de melanoma invasivo com grande quantidade de melanina. **B)** ausência de expressão nuclear de p16 onde se visualiza os núcleos com o mesmo aspecto do controle negativo (**A**). TMA (400X).

Figura 1 - Demonstração da comparação entre a expressão nuclear do marcador no tumor e o controle negativo BSA.



Legenda: **A)** controle negativo BSA de melanoma invasivo com grande quantidade de melanina. **B)** expressão nuclear de p53 onde as setas indicam os núcleos positivos, que não são vistos no controle negativo (A). TMA (400X).

Figura 2 - Demonstração da comparação entre a expressão nuclear do marcador no tumor e o controle negativo BSA.

Padronização da Leitura

Marcação Nuclear

Utilizou-se método semi-quantitativo considerando-se a proporção de células dentro do tumor com positividade nuclear. O ponto de corte para cada anticorpo foi determinado através de dados da literatura e está representado no Quadro 3 (REED et al. 1995; MAELANDSMO et al. 1996a; SPARROW et al. 1998; KARJALAINEN et al. 1999; FLORENES et al. 2000; KLAES et al. 2001; TANAKA et al. 2001; ALONSO et al. 2004).

AC	NEGATIVO	POSITIVO
p16	< 5%	≥ 5%
Ciclina D1	< 5%	≥ 5%
CDK 4	< 5%	≥ 5%
pRb	< 10%	≥ 10%
p53	< 10%	≥ 10%
p21	< 10%	≥ 10%

Quadro 3 - Determinação de positividade para os anticorpos estudados, de acordo com a proporção de células tumorais com marcação nuclear.

Marcação Citoplasmática

Realizou-se a análise da marcação citoplasmática apenas para o anticorpo anti-Cdk4, utilizando-se método semi-quantitativo e considerando-

se a intensidade da marcação e a proporção de células tumorais marcadas, como mostra a Quadro 4 e baseado em dados de literatura (SOINI et al. 2001; AN et al. 1999; BACHMANN et al. 2004). A pontuação final foi determinada através da soma dos escores de intensidade e proporção. Foram considerados positivos os casos com soma de escores final maior que 4.

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

Quadro 4 - Metodologia de determinação dos escores para análise de marcação citoplasmática do anticorpo anti-Cdk4.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação da relação entre as variáveis histológicas e expressão dos marcadores estudados foi utilizado o teste de associação qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando pelo menos uma das frequências esperadas foi menor que 5. A análise de sobrevida foi realizada através do método de Kaplan-Meier e para comparação das curvas utilizou-se o teste de log-rank.

Para a comparação da expressão dos diferentes marcadores nos pares de amostras de tumores primários e tumores metastáticos, foi utilizado, quando possível, o teste de McNemar.

Para todos os testes estatísticos, estabeleceu-se erro $\alpha = 5\%$, ou seja, os resultados dos testes foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Para as análises de sobrevida foram excluídos os casos de melanoma *in situ* e para a análise comparativa de expressão entre tumores primários e metastáticos foram excluídos os tumores primários correspondentes às metástases incluídas no estudo.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital do Câncer em 04/02/2003 (CEP – nº 465/03)

4 RESULTADOS

4.1 ESTATÍSTICA DESCRITIVA

Dos 136 pacientes selecionados, houve 81 (59,6%) do sexo feminino e 55 (40,4%) do sexo masculino, com média de idade ao diagnóstico de 52,57 anos, variando de 14 a 89 anos. O tumor primário localizou-se no tronco em 64 pacientes (47,1%), nas extremidades em 60 pacientes (44,1%) e na região de cabeça e pescoço em 12 pacientes (8,8%). Houve predomínio dos estadios IA e IB ao diagnóstico, como mostra a Tabela 2. Dos 116 melanomas invasivos, 13 mostraram crescimento radial (11,2%) e 103 crescimento vertical (88,8%). Apenas 1 paciente referiu história familiar de melanoma e em 107 pacientes esta informação não estava disponível. Os outros 28 pacientes negaram antecedentes familiares de melanoma. O tempo médio de acompanhamento dos pacientes foi de 59,67 meses, variando de 5,63 a 391,55 meses, com 10,3% de perda de seguimento (12 pacientes).

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes com melanoma cutâneo extensivo superficial de acordo com o estadiamento ao diagnóstico segundo o AJCC 2002.

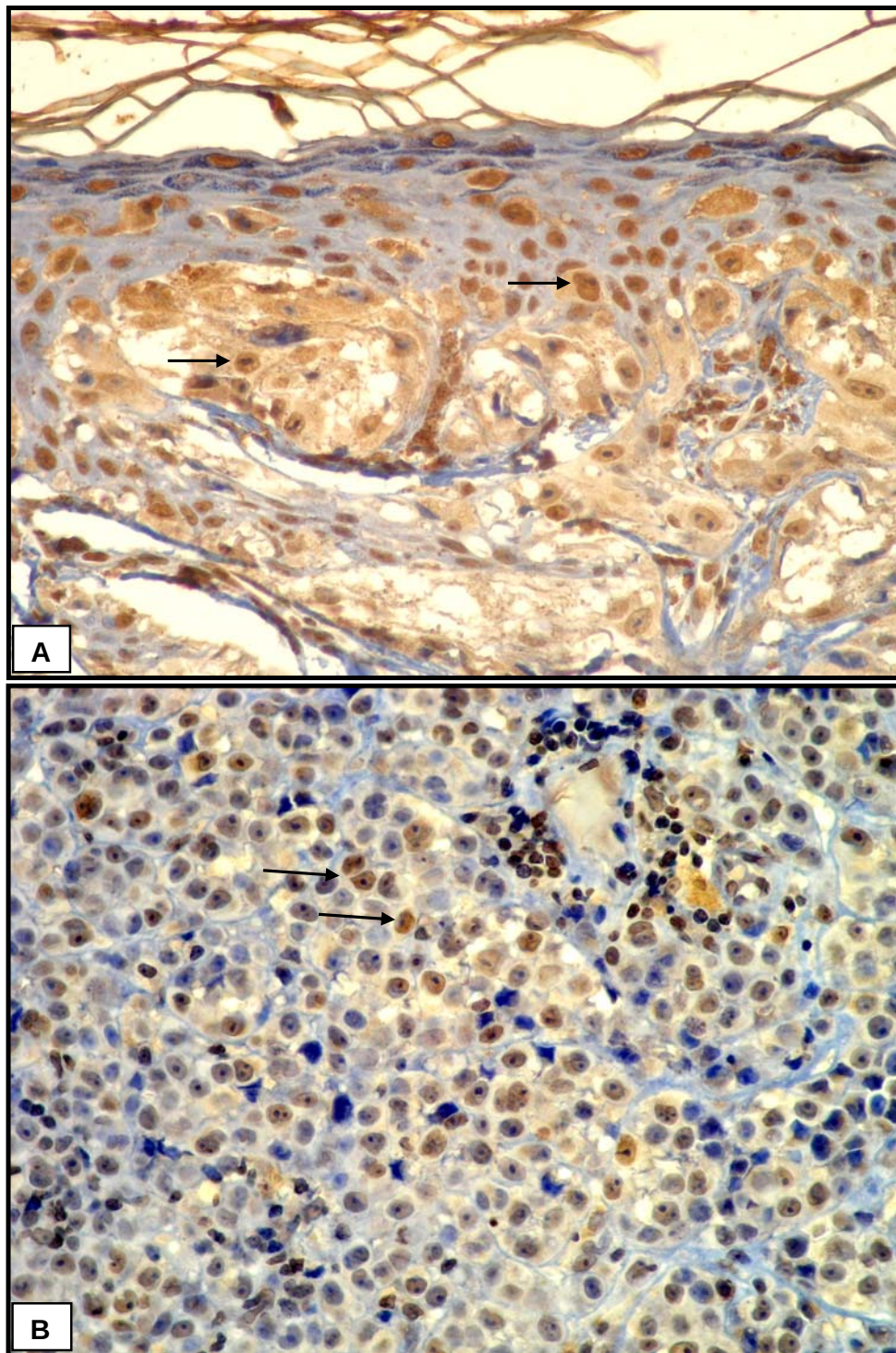
Estádio	Nº de casos (%)
0	20 (14,7)
IA	40 (29,4)
IB	29 (21,3)
IIA	15 (11,0)
IIB	12 (8,8)
IIC	6 (4,4)
IIIA	8 (5,9)
IIIB	4 (2,9)
IV	2 (1,5)
TOTAL	136 (100)

p16

Das 136 amostras de tumores primários, foi possível a análise da expressão de p16 em 125 casos. Os 11 casos restantes não apresentaram material suficiente para análise (1 melanoma fino, 8 melanomas de 1,01 a 2mm e 2 melanomas de 2,01 a 4mm). Dos 10 nevos estudados, foi possível a análise em 8 casos. Em todos os 29 casos de tumor metastático, a análise de expressão de p16 foi realizada com sucesso. Do total de 162 casos analisados, incluindo tumor primário, metastático e nevos, houve positividade em 3,1% (5 casos). Todos os casos positivos correspondiam a tumores com espessura menor ou igual a 1,0 mm, incluindo os melanomas *in situ*, representando 4% dos tumores primários analisados. Todos os nevos, melanomas invasivos acima de 1,0 mm e todos os tumores metastáticos foram negativos para p16 (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição dos 162 casos analisados de acordo com a positividade e negatividade nuclear para p16.

	p16 [número de casos / (%)]	
	negativos	positivos
Melanomas <i>in situ</i>	18 (90,0)	2 (10,0)
Melanomas $\leq 1,0\text{mm}$	40 (93,0)	3 (7,0)
Melanomas 1,01 – 2,0mm	23 (100,0)	-
Melanomas 2,01 – 4,0mm	23 (100,0)	-
Melanomas $> 4,0\text{mm}$	16 (100,0)	-
Metástases	29 (100,0)	-
Nevos	8 (100,0)	-
TOTAL	157 (96,9)	5 (3,1)



Legenda: **A)** melanoma *in situ*, onde nota-se a positividade nuclear também na epiderme normal. As setas evidenciam os núcleos positivos das células tumorais. **B)** melanoma fino. As setas indicam alguns dos núcleos positivos. Cortes convencionais (400X).

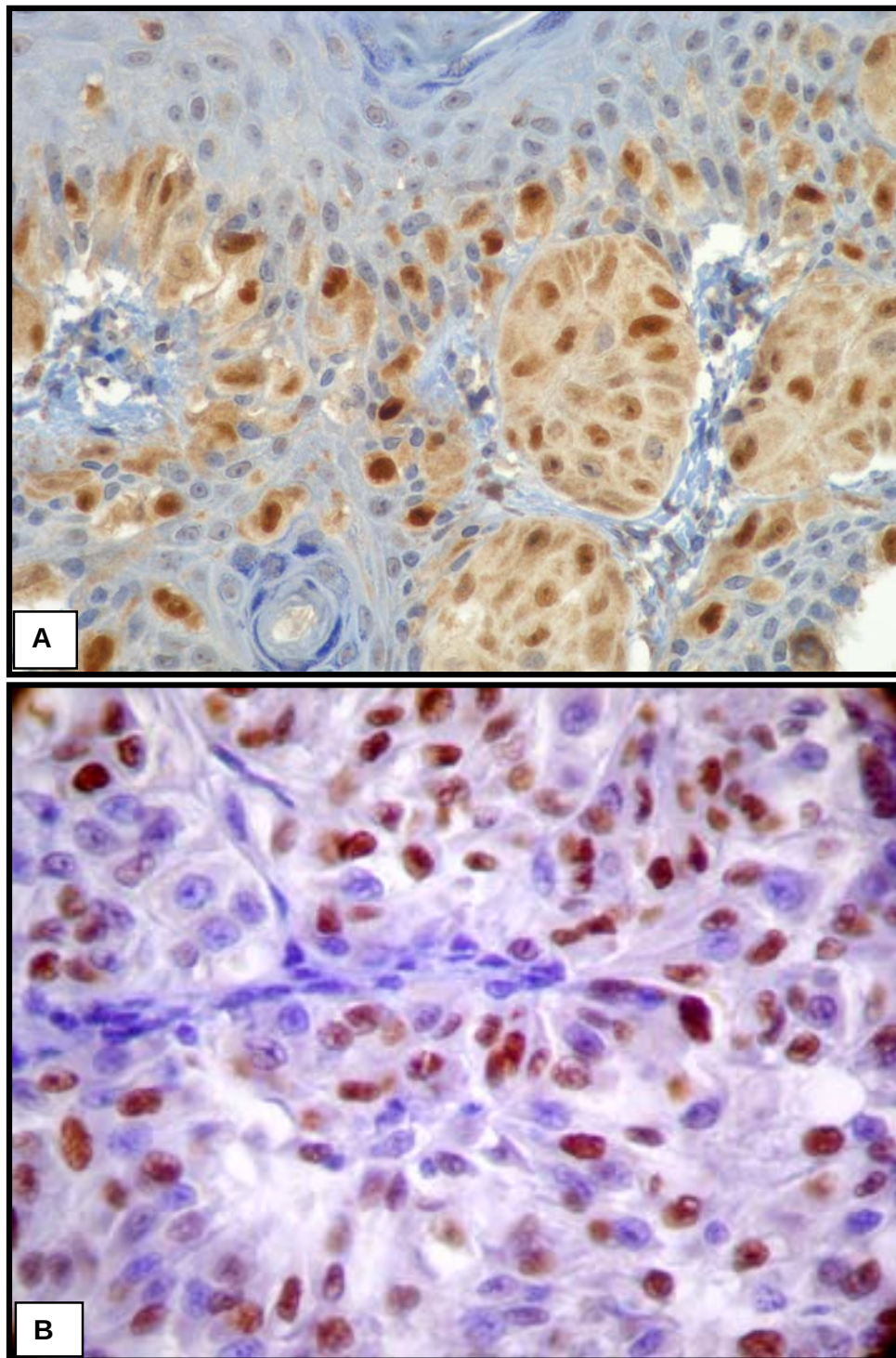
Figura 3 - Expressão nuclear de p16.

Ciclina D1

Das 136 amostras de tumores primários, foi possível a análise da expressão de ciclina D1 em 125 casos. Os 11 casos restantes não apresentaram material suficiente para análise (2 melanomas *in situ*, 3 melanomas finos, 4 melanomas de 1,01 a 2mm e 2 melanomas de 2,01 a 4mm). Dos 10 nevos estudados, foi possível a análise em 8 casos. Em todos os 29 casos de tumor metastático, a análise de expressão de ciclina D1 foi realizada com sucesso. Do total de 162 casos analisados, incluindo tumor primário, metastático e nevos, houve positividade em 13% (21 casos). Os tumores primários apresentaram positividade de 16% (20 casos) e as metástases apresentaram positividade de 3,4% (1 caso). Nenhum dos nevos apresentou positividade para ciclina D1 (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição dos 162 casos analisados de acordo com a positividade e negatividade nuclear para ciclina D1.

	Ciclina D1 [número de casos / (%)]	
	negativos	positivos
Melanomas <i>in situ</i>	14 (77,8)	4 (22,2)
Melanomas $\leq 1,0\text{mm}$	31 (75,6)	10 (24,4)
Melanomas 1,01 – 2,0mm	25 (92,6)	2 (7,4)
Melanomas 2,01 – 4,0mm	20 (87,0)	3 (13,0)
Melanomas $> 4,0\text{mm}$	15 (93,8)	1 (6,3)
Metástases	28 (96,6)	1 (3,4)
Nevos	8 (100,0)	-
TOTAL	141 (87,0)	21 (13,0)



Legenda: **A)** melanoma fino, onde se nota a positividade nuclear tanto na porção invasiva quanto na porção intra-epidérmica do tumor. *Corte convencional (400X).* **B)** melanoma invasivo acima de 1,0mm. *TMA (400X).*

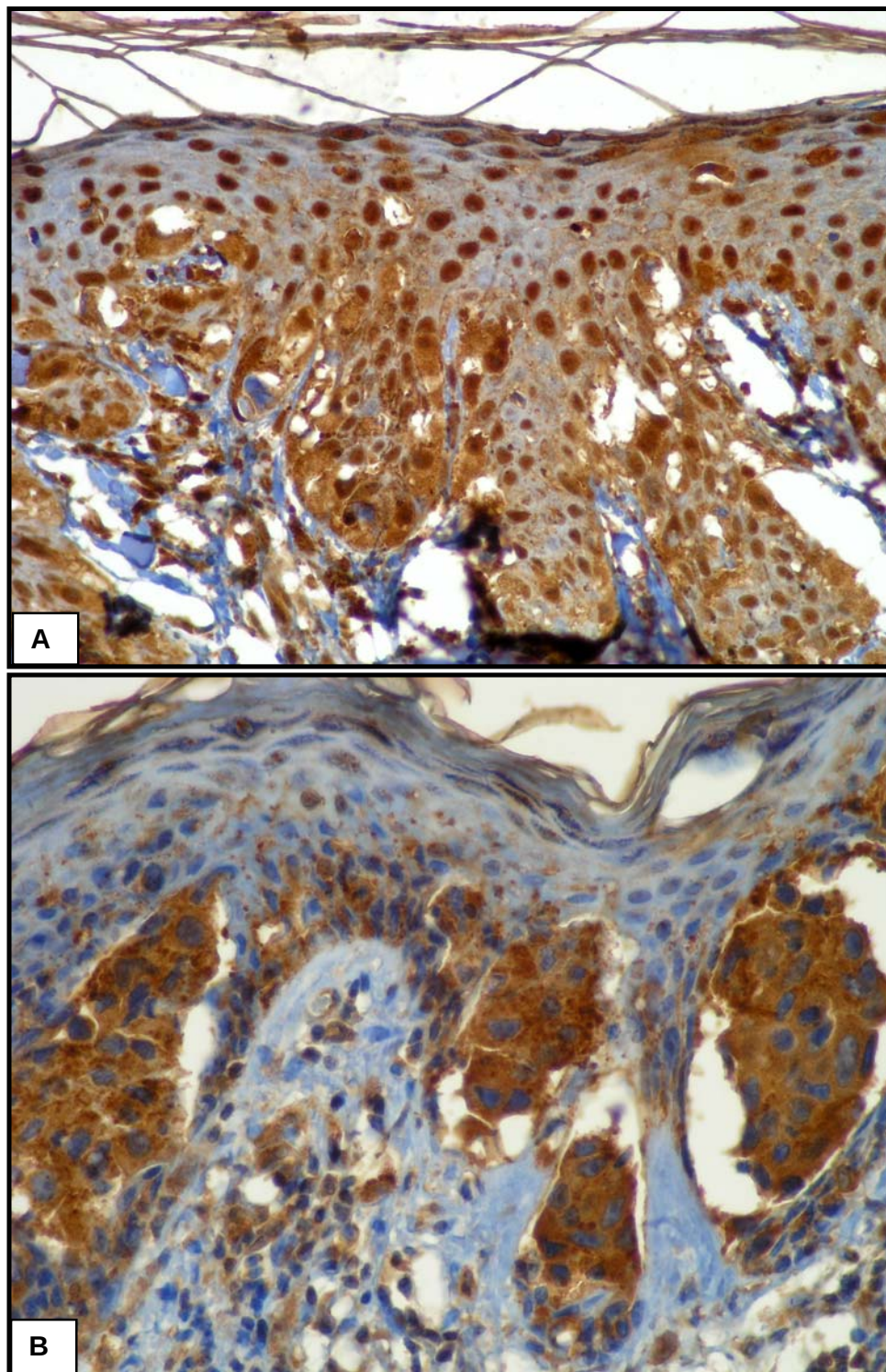
Figura 4 - Expressão nuclear de ciclina D1.

Cdk4

Das 136 amostras de tumores primários, foi possível a análise da expressão de Cdk4 em 124 casos. Os 12 casos restantes não apresentaram material suficiente para análise (2 melanomas finos, 8 melanomas de 1,01 a 2mm e 2 melanomas de 2,01 a 4mm). Dos 10 nevos estudados, foi possível a análise em 8 casos. Em todos os 29 casos de tumor metastático, a análise de expressão de Cdk4 foi realizada com sucesso. Do total de 161 casos analisados, incluindo tumor primário, metastático e nevos, houve positividade nuclear em 51,6% (83 casos) e citoplasmática em 65,2% (105 casos). Nos tumores primários, houve positividade nuclear de 55,6% (69 casos) e citoplasmática de 71% (88 casos), enquanto nas metástases a nuclear foi de 44,8% (13 casos) e a citoplasmática de 41,4% (12 casos). Apenas 1 nevo apresentou positividade nuclear para Cdk4 (10%), enquanto 5 nevos apresentaram positividade citoplasmática para este anticorpo (62,5%) (Tabela 5).

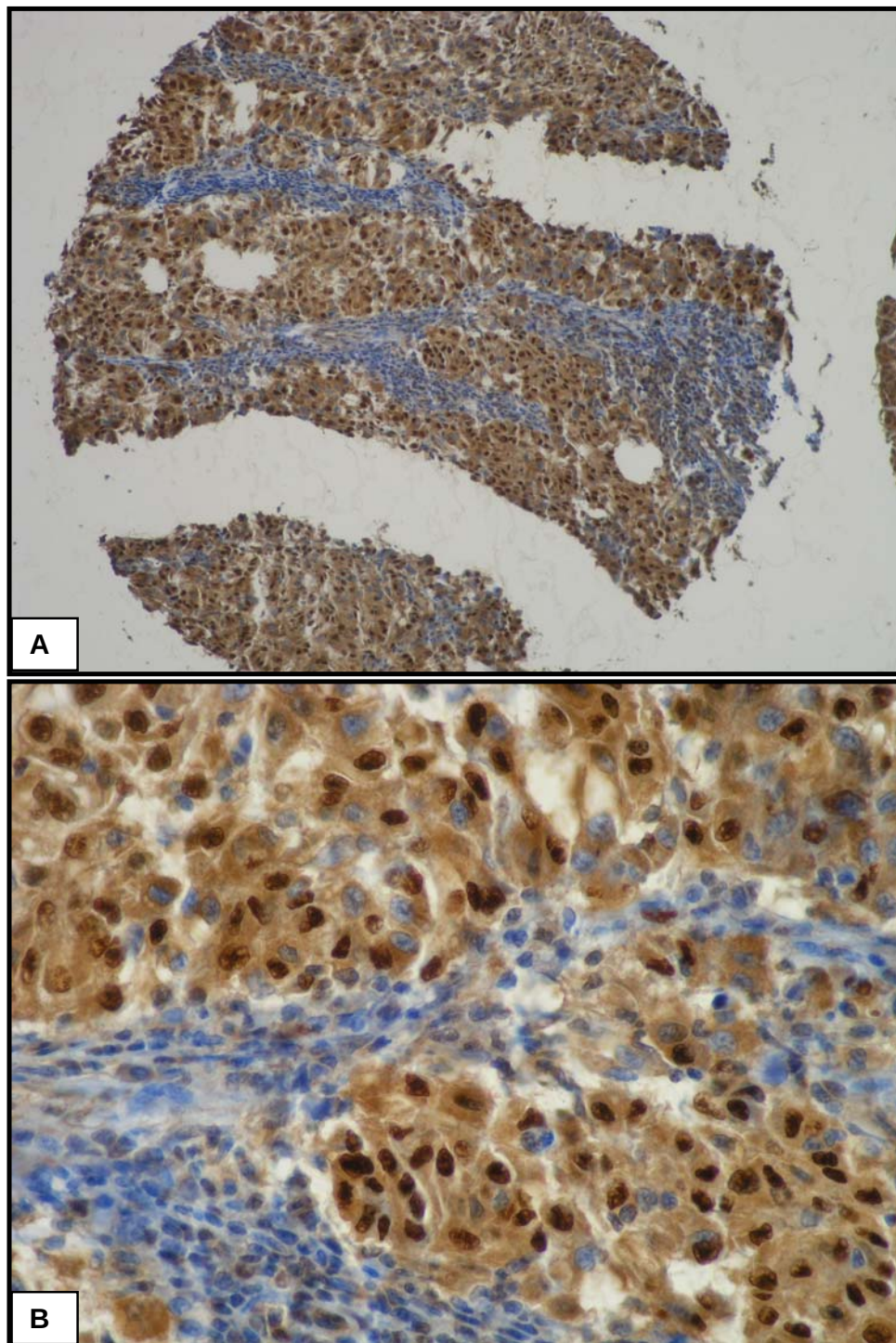
Tabela 5 - Distribuição dos 161 casos analisados de acordo com a positividade e negatividade nuclear e citoplasmática para Cdk4.

	Cdk4 [número de casos / (%)]			
	nuclear		citoplasmático	
	negativos	positivos	negativos	positivos
Melanomas <i>in situ</i>	12 (60,0)	8 (40,0)	5 (25,0)	15 (75,0)
Melanomas $\leq 1,0\text{mm}$	28 (66,7)	14 (33,3)	8 (19,0)	34 (81,0)
Melanomas 1,01 – 2,0mm	1 (4,3)	22 (95,7)	7 (29,2)	17 (70,8)
Melanomas 2,01 – 4,0mm	8 (34,8)	15 (65,2)	12 (54,5)	10 (45,5)
Melanomas $> 4,0\text{mm}$	6 (37,5)	10 (62,5)	4 (25,0)	12 (75,0)
Metástases	16 (55,2)	13 (44,8)	17 (58,6)	12 (41,4)
Nevos	7 (87,5)	1 (12,5)	3 (37,5)	5 (62,5)
TOTAL	78 (48,4)	83 (51,6)	56 (34,8)	105 (65,2)



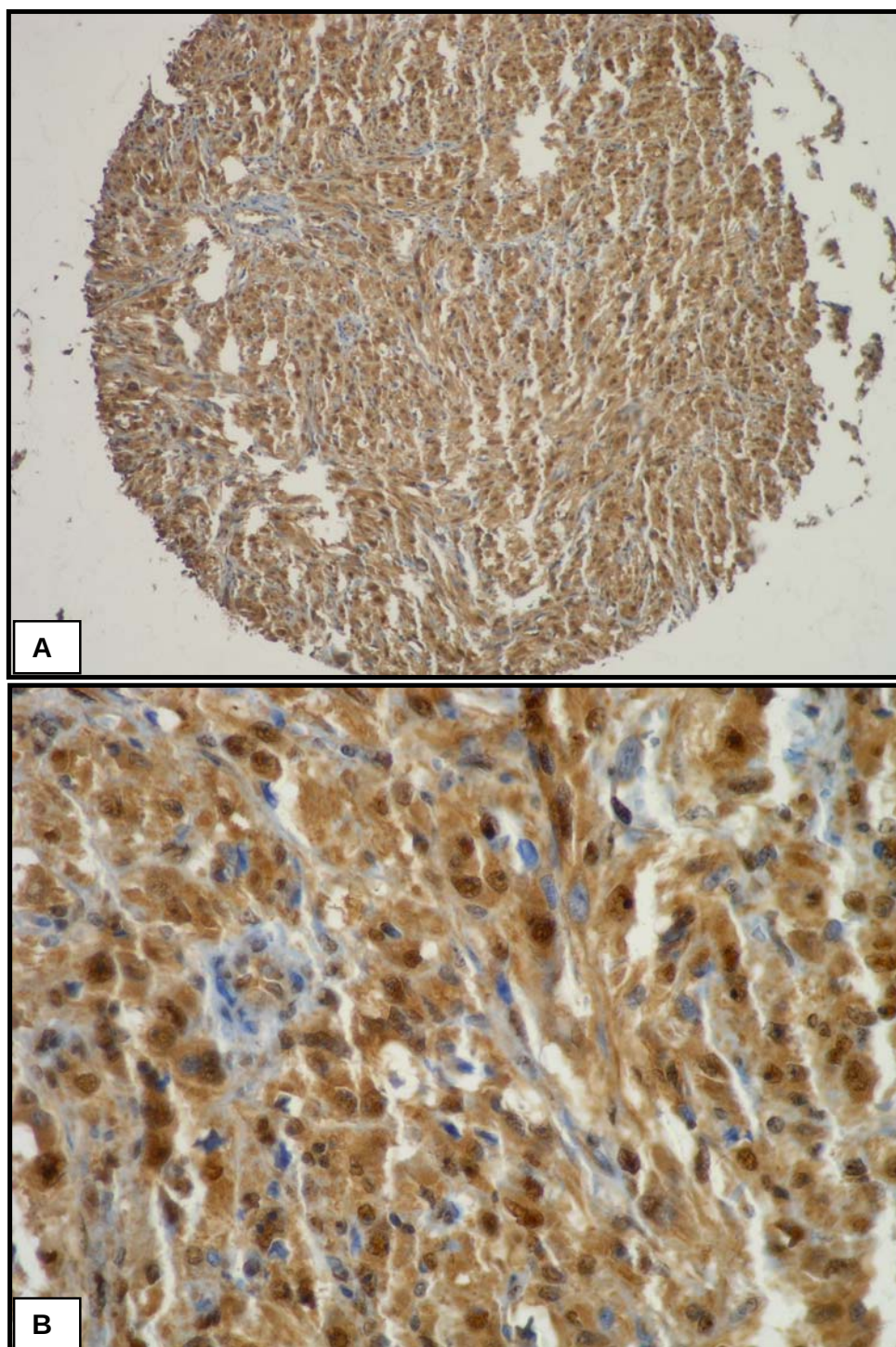
Legenda: **A)** melanoma *in situ*, onde se nota a positividade nuclear tanto na epiderme normal quanto no tumor, que apresenta também positividade citoplasmática. Corte convencional (400X). **B)** melanoma *in situ*. Verifica-se que as células tumorais apresentam núcleos negativos com positividade citoplasmática. Corte convencional (400X).

Figura 5 - Expressão nuclear e citoplasmática de Cdk4.



Legenda: **A)** melanoma invasivo acima de 1,0mm.TMA (100X). **B)** maior aumento (400X) do tumor representado em **A**, que mostra positividade nuclear e citoplasmática.

Figura 6 - Expressão nuclear e citoplasmática de Cdk4.



Legenda: **A)** metástase pulmonar de melanoma cutâneo. *TMA (100X)*. **B)** maior aumento (400X) da metástase representada em **B**, que mostra positividade nuclear e citoplasmática.

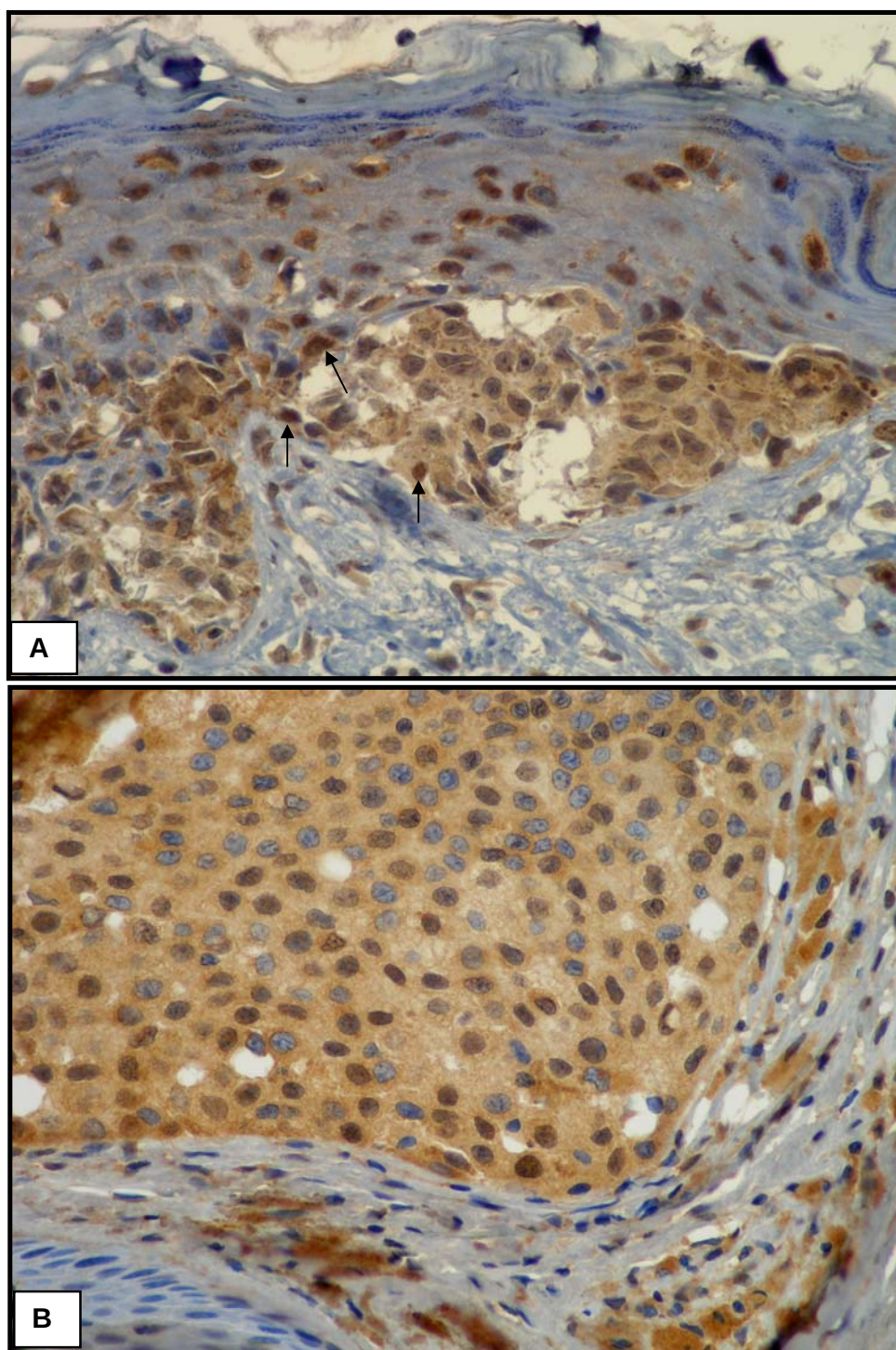
Figura 7 - Expressão nuclear e citoplasmática de Cdk4.

pRb

Das 136 amostras de tumores primários, foi possível a análise da expressão de pRb em 124 casos. Os 12 casos restantes não apresentaram material suficiente para análise (1 melanoma *in situ*, 1 melanoma fino, 8 melanomas de 1,01 a 2mm e 2 melanomas de 2,01 a 4mm). Dos 10 nevos estudados, foi possível a análise em 8 casos. Em todos os 29 casos de tumor metastático, a análise de expressão de pRb foi realizada com sucesso. Do total de 161 casos analisados, incluindo tumor primário, metastático e nevos, houve positividade em 28% (45 casos). Os tumores primários apresentaram positividade de 31,4% (39 casos) e as metástases apresentaram positividade de 20,7% (6 caso). Nenhum dos nevos apresentou positividade para pRb (Tabela 6).

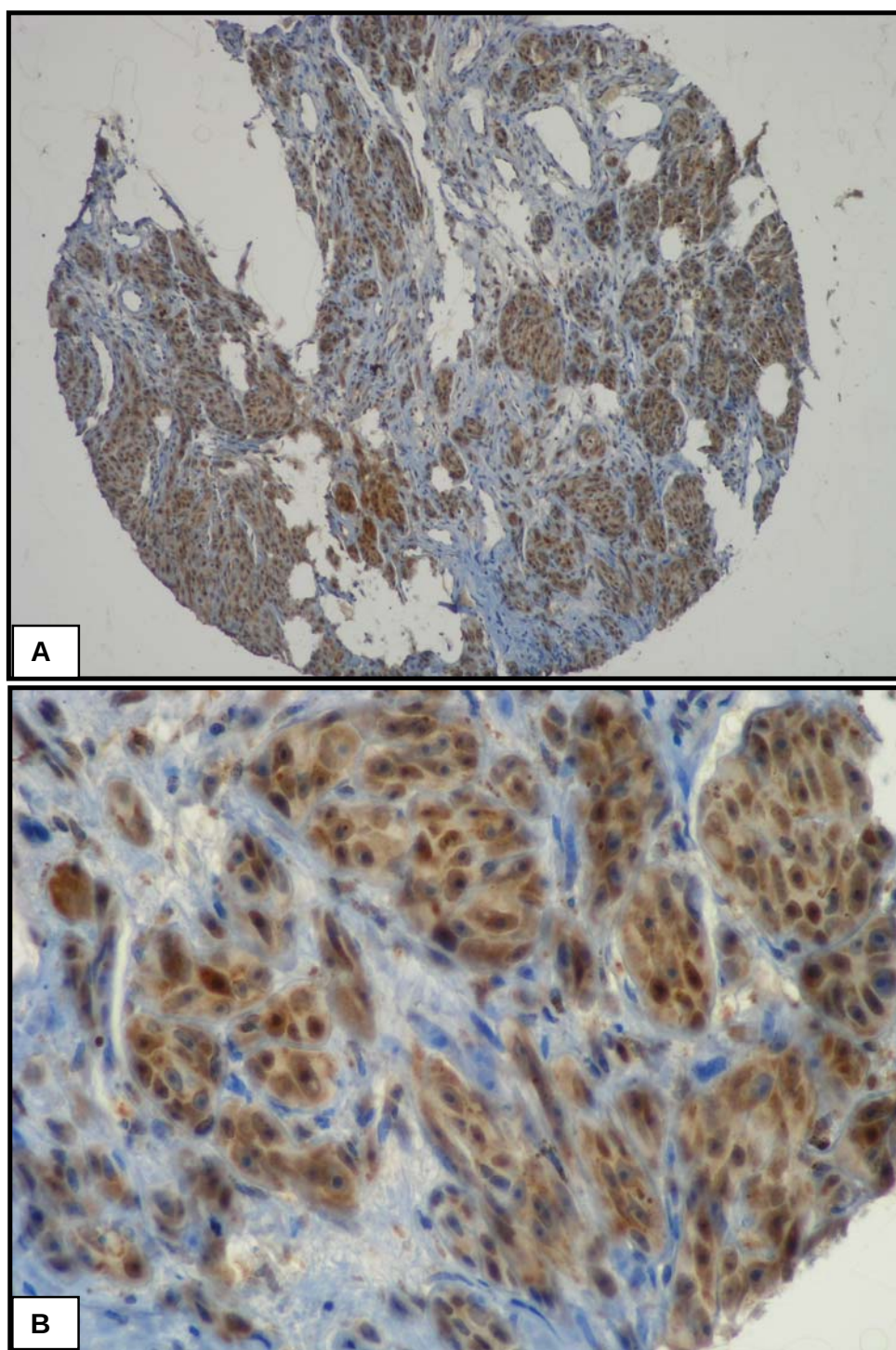
Tabela 6 - Distribuição dos 161 casos analisados de acordo com a positividade e negatividade nuclear para pRb.

	pRb [número de casos / (%)]	
	negativos	positivos
Melanomas <i>in situ</i>	11 (57,9)	8 (42,1)
Melanomas $\leq 1,0\text{mm}$	30 (69,8)	13 (30,2)
Melanomas 1,01 – 2,0mm	19 (82,6)	4 (17,4)
Melanomas 2,01 – 4,0mm	17 (73,9)	6 (26,1)
Melanomas $> 4,0\text{mm}$	8 (50,0)	8 (50,0)
Metástases	23 (79,3)	6 (20,7)
Nevos	8 (100,0)	-
TOTAL	116 (72,0)	45 (28,0)



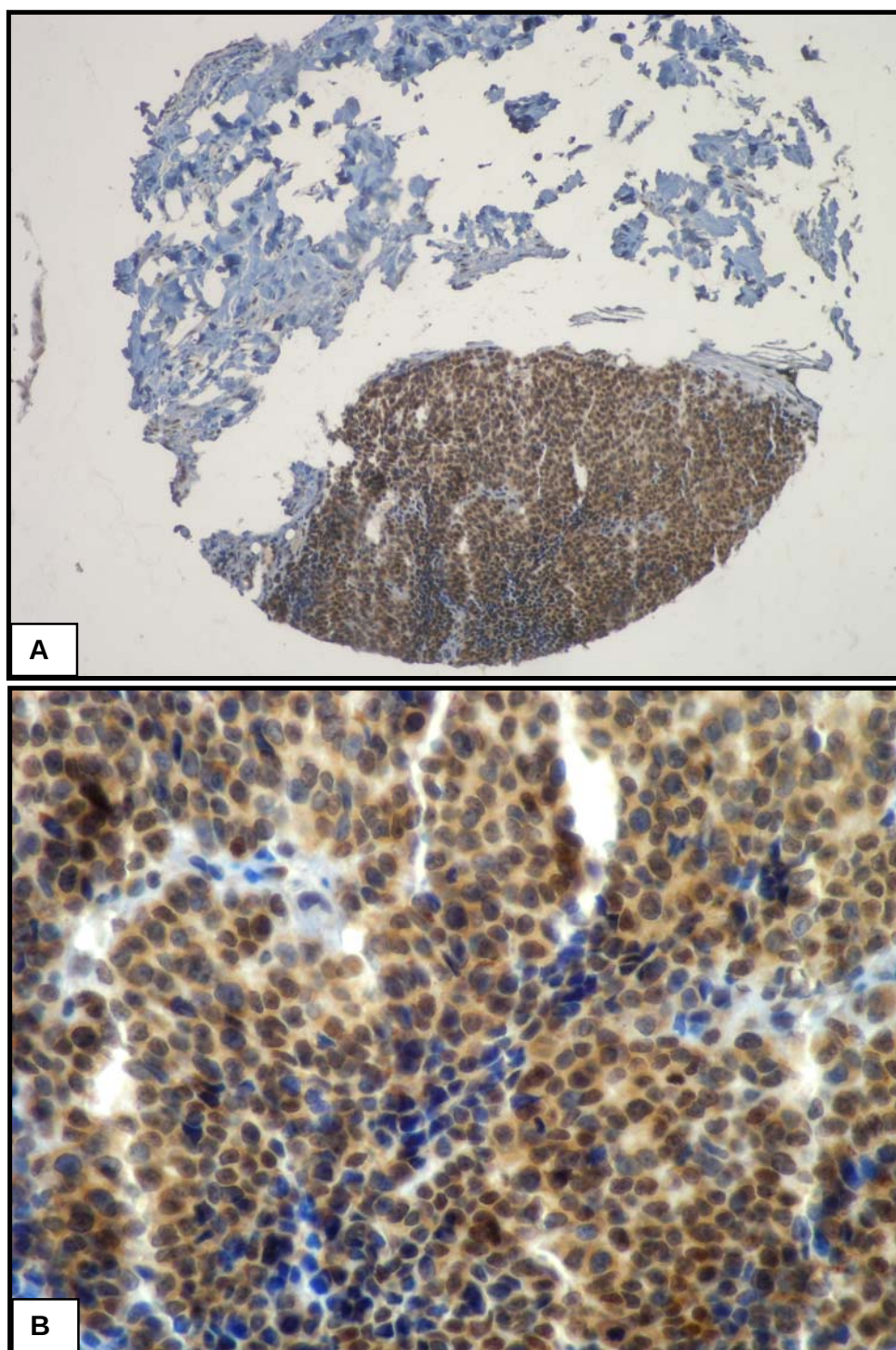
Legenda: **A)** melanoma *in situ*. As setas indicam núcleos com positividade. Corte convencional (400X). **B)** melanoma fino. Verifica-se área com presença de núcleos positivos e negativos. Corte convencional (400X).

Figura 8 - Expressão nuclear de pRb.



Legenda: **A)** melanoma invasivo acima de 1,0mm.TMA (100X). **B)** maior aumento (400X) do tumor representado em **A**, evidenciando positividade nuclear.

Figura 9 - Expressão nuclear de pRb.



Legenda: **A)** metástase cutânea de melanoma cutâneo, representando mais de 25% do cilindro. TMA (100X). **B)** maior aumento (400X) da metástase representada em **A**, que mostra positividade nuclear.

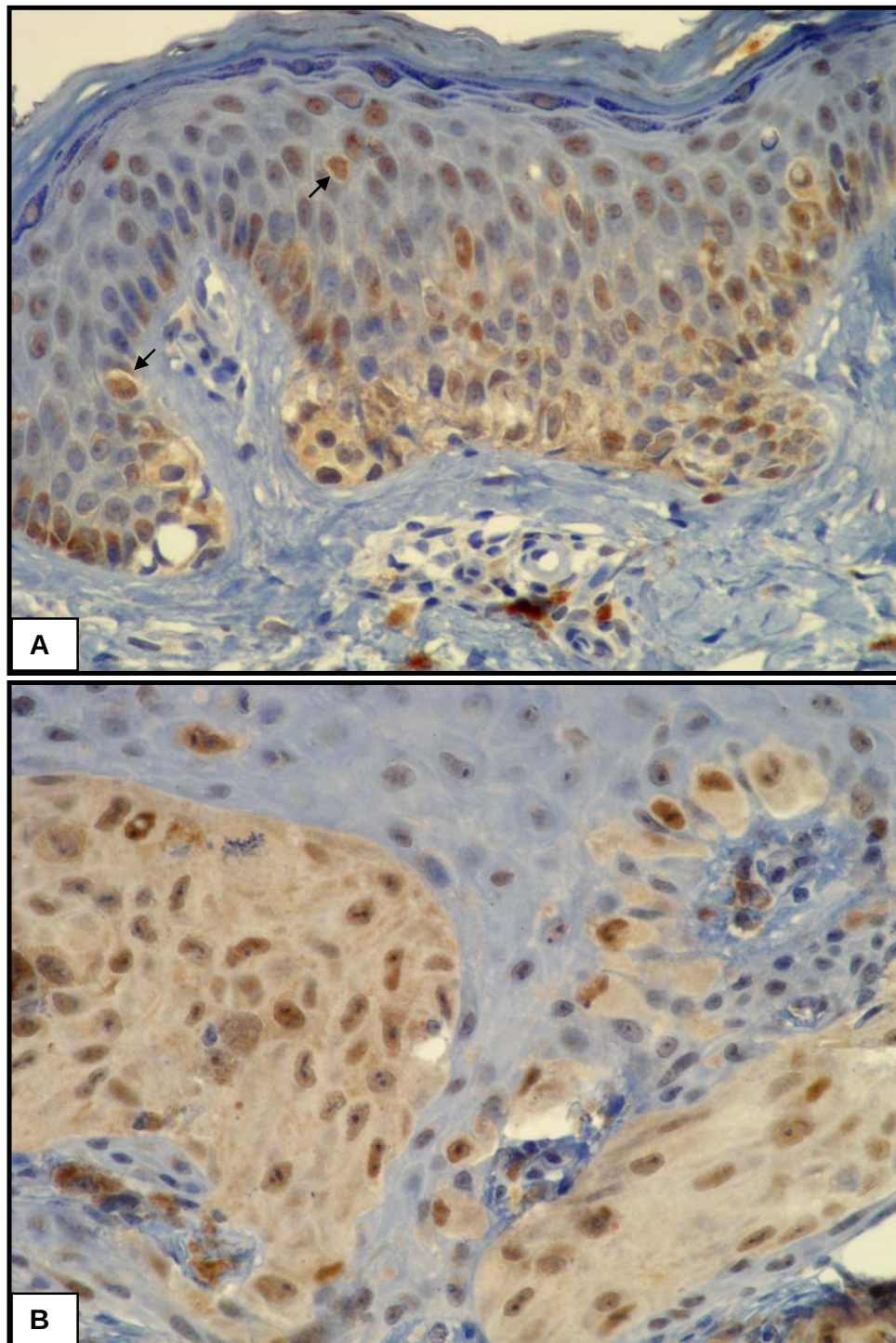
Figura 10 - Expressão nuclear de pRb.

p53

Das 136 amostras de tumores primários, foi possível a análise da expressão de p53 em 125 casos. Os 11 casos restantes não apresentaram material suficiente para análise (1 melanoma fino, 8 melanomas de 1,01 a 2mm e 2 melanomas de 2,01 a 4mm). Dos 10 nevos estudados, foi possível a análise em 8 casos. Em todos os 29 casos de tumor metastático, a análise de expressão de p53 foi realizada com sucesso. Do total de 162 casos analisados, incluindo tumor primário, metastático e nevos, houve positividade em 34% (55 casos). Os tumores primários apresentaram positividade de 32,8% (41 casos) e as metástases apresentaram positividade de 44,8% (13 casos). Os nevos apresentaram positividade para p53 de 12,5% (1 caso) (Tabela 7).

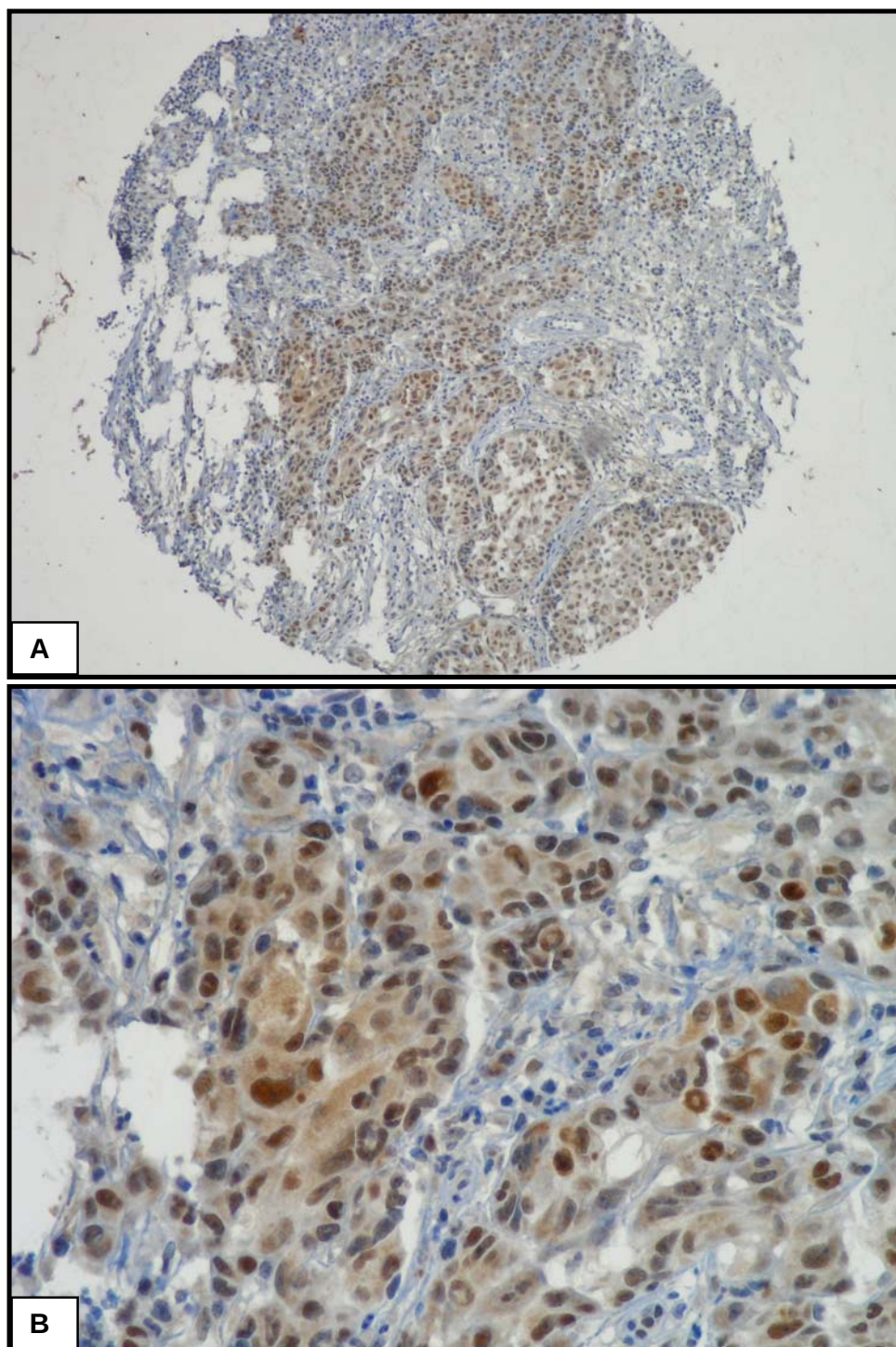
Tabela 7 - Distribuição dos 162 casos analisados de acordo com a positividade e negatividade nuclear para p53.

	p53 [número de casos / (%)]	
	negativos	positivos
Melanomas <i>in situ</i>	17 (85,0)	3 (15,0)
Melanomas $\leq 1,0\text{mm}$	36 (83,7)	7 (16,3)
Melanomas 1,01 – 2,0mm	13 (56,5)	10 (43,5)
Melanomas 2,01 – 4,0mm	10 (43,5)	13 (56,5)
Melanomas $> 4,0\text{mm}$	8 (50,0)	8 (50,0)
Metástases	16 (52,2)	13 (44,8)
Nevos	7 (87,5)	1 (12,5)
TOTAL	107 (66,0)	55 (34,0)



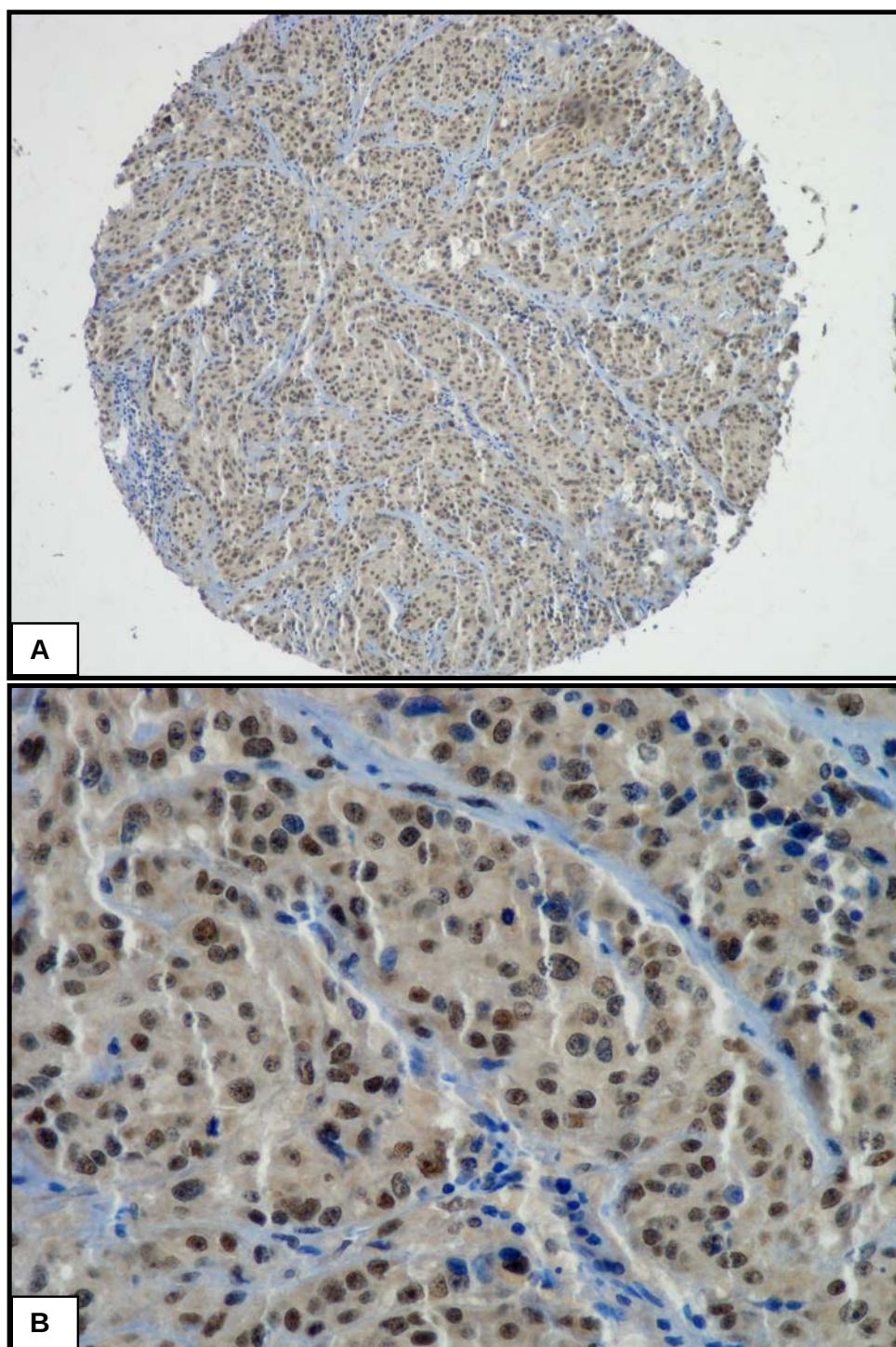
Legenda: **A)** melanoma *in situ*. As setas indicam núcleos com positividade. Nota-se que a epiderme normal também apresenta positividade nuclear. Corte convencional (400X). **B)** melanoma fino. Verifica-se positividade nuclear tanto na porção invasiva quanto na porção intra-epidérmica do tumor. Corte convencional (400X).

Figura 11 - Expressão nuclear de p53.



Legenda: **A)** melanoma invasivo acima de 1,0mm.TMA (100X). **B)** maior aumento (400X) do tumor representado em **A**, evidenciando positividade nuclear.

Figura 12 - Expressão nuclear de p53.



Legenda: **A)** metástase linfonodal de melanoma cutâneo. *TMA* (100X). **B)** maior aumento (400X) da metástase representada em **A**, que mostra positividade nuclear.

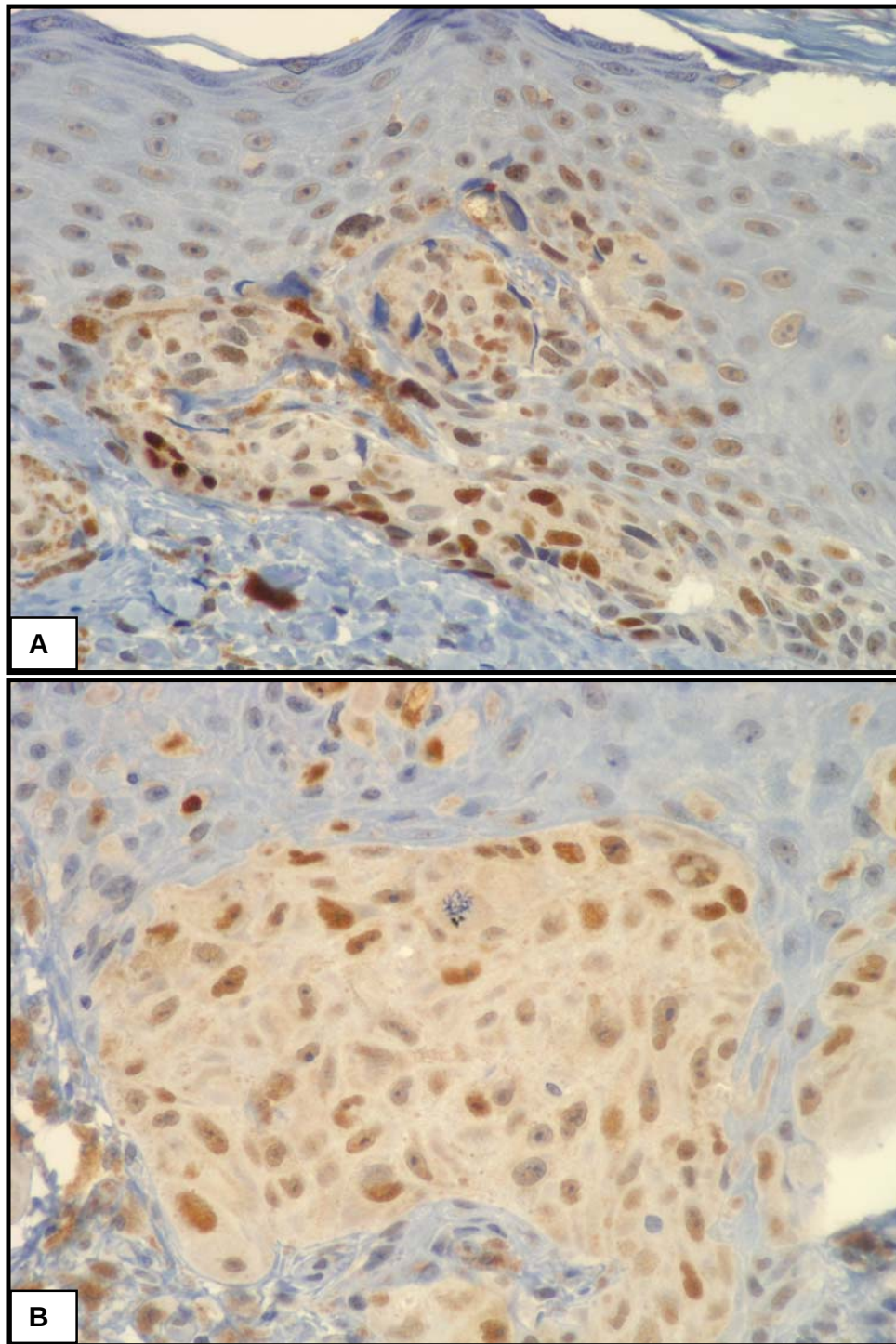
Figura 13 - Expressão nuclear de p53.

p21

Das 136 amostras de tumores primários, foi possível a análise da expressão de p21 em 128 casos. Os 8 casos restantes não apresentaram material suficiente para análise (1 melanoma fino, 5 melanomas de 1,01 a 2mm e 2 melanomas de 2,01 a 4mm). Dos 10 nevos estudados, foi possível a análise em 8 casos. Em todos os 29 casos de tumor metastático, a análise de expressão de p21 foi realizada com sucesso. Do total de 165 casos analisados, incluindo tumor primário, metastático e nevos, houve positividade em 34,5% (57 casos). Os tumores primários apresentaram positividade de 36,7% (47 casos) e as metástases apresentaram positividade de 34,5% (10 casos). Nenhum dos nevos apresentou positividade para p21 (Tabela 8).

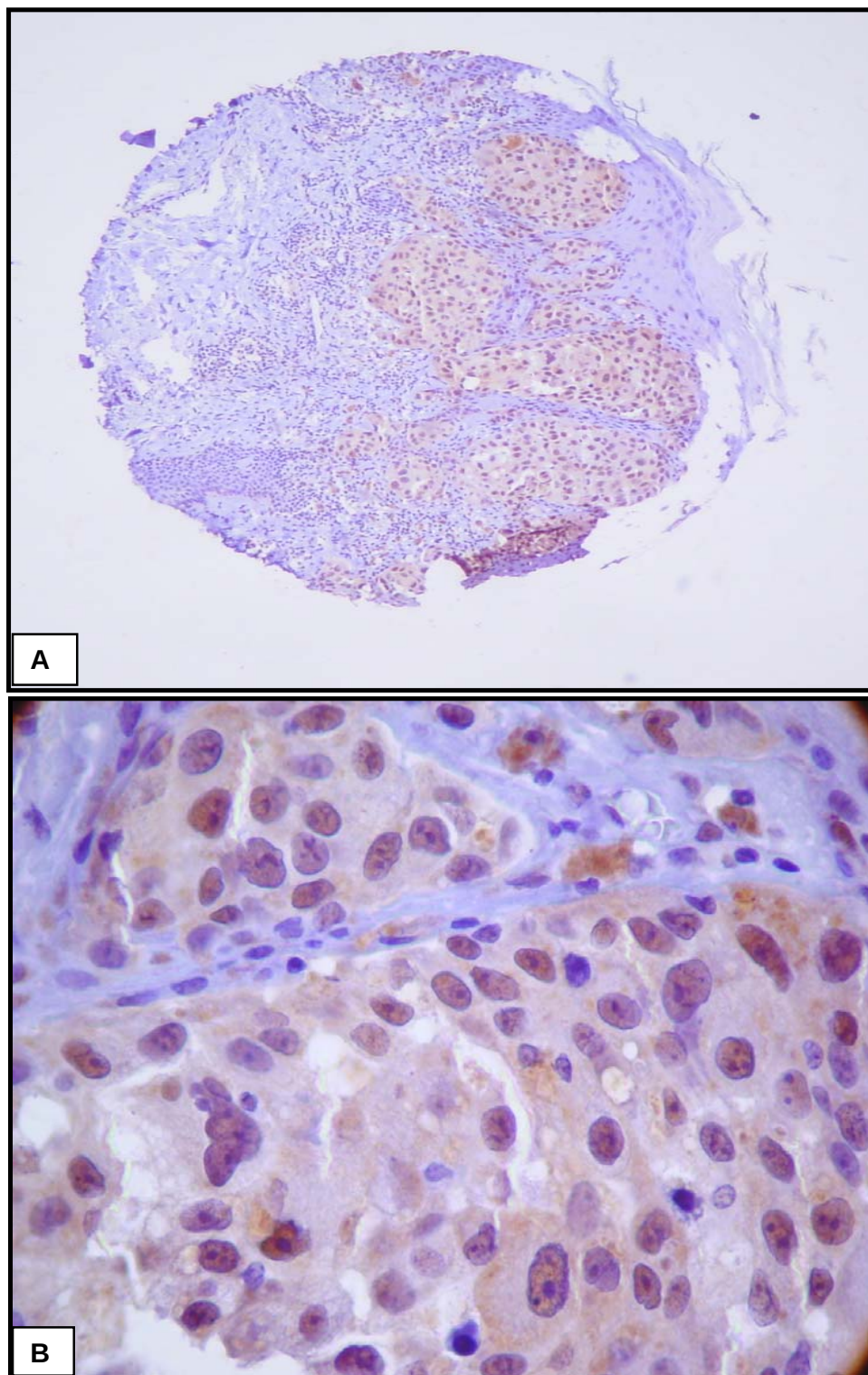
Tabela 8 - Distribuição dos 165 casos analisados de acordo com a positividade e negatividade nuclear para p21.

	p21 [número de casos / (%)]	
	negativos	positivos
Melanomas <i>in situ</i>	15 (75,0)	5 (25,0)
Melanomas $\leq 1,0\text{mm}$	32 (74,4)	11 (25,6)
Melanomas 1,01 – ,02mm	15 (57,7)	11(42,3)
Melanomas 2,01 – 4,0mm	11 (47,8)	12 (52,2)
Melanomas $> 4,0\text{mm}$	8 (50,0)	8 (50,0)
Metástases	19 (65,5)	10 (34,5)
Nevos	8 (100,0)	-
TOTAL	108 (65,5)	57 (34,5)



Legenda: **A)** melanoma *in situ*, positividade nuclear. Corte convencional (400X). **B)** melanoma fino, positividade nuclear. Corte convencional (400X).

Figura 14 - Expressão nuclear de p21.



Legenda: **A)** melanoma invasivo acima de 1,0mm.TMA (100X). **B)** maior aumento (400X) do tumor representado em **A**, evidenciando positividade nuclear.

Figura 15 - Expressão nuclear de p21.

4.2 ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DOS MARCADORES BIOLÓGICOS E ESPESSURA DO TUMOR

O comportamento biológico dos melanomas finos se mostrou muito semelhante ao comportamento dos melanomas *in situ*, quanto à expressão dos marcadores estudados. Da mesma forma, os melanomas invasivos acima de 1,0 mm também apresentaram comportamento semelhante entre si. Assim sendo, optou-se pelo agrupamento dos melanomas de comportamento semelhante, estudando-se 2 grupos de tumores primários: melanomas com espessura menor ou igual a 1,0 mm (*in situ* e finos) e melanomas com espessura maior que 1,0 mm.

p16

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a espessura do tumor primário e a expressão de p16 ($p = 0,058$). Os 5 únicos casos com positividade para este anticorpo representavam melanomas com espessura menor ou igual a 1,0mm (positividade de 7,9% para este grupo de melanomas). Nenhum dos melanomas invasivos com espessura maior que 1,0mm apresentou positividade para p16 (Tabela 9).

Tabela 9 - Distribuição dos 125 casos de melanomas primários analisados de acordo com a positividade para p16 e espessura do tumor.

Espessura do tumor (mm)	p16 [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
≤ 1,0	58 (92,1)	5 (7,9)	63 (50,4)
> 1,0	62 (100,0)	-	62 (49,6)
TOTAL	120 (96,0)	5 (4,0)	125 (100,0)

Ciclina D1

Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a espessura do tumor primário e a expressão de ciclina D1 com $p = 0,026$. Os melanomas com espessura menor ou igual a 1,0mm apresentaram positividade de 23,7% e os melanomas acima de 1,0mm de 9,1% (Tabela 10).

Tabela 10 - Distribuição dos 125 casos de melanomas primários analisados de acordo com a positividade para ciclina D1 e espessura do tumor.

Espessura do tumor (mm)	Ciclina D1 [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
≤ 1,0	45 (76,3)	14 (23,7)	59 (47,2)
> 1,0	60 (90,9)	6 (9,1)	66 (52,8)
TOTAL	105 (84,0)	20 (16,0)	125 (100,0)

Cdk4

Tanto a expressão nuclear quanto a expressão citoplasmática de Cdk4 mostrou associação estatisticamente significativa com a espessura do tumor primário ($p < 0,001$ e $p = 0,048$, respectivamente). Os melanomas com espessura menor ou igual a 1,0mm apresentaram positividade nuclear de 35,5% e citoplasmática de 79%. Os melanomas com espessura acima de 1,0mm apresentaram positividade nuclear de 78,5% e citoplasmática de 62,9% (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11 - Distribuição dos 124 casos de melanomas primários analisados de acordo com a positividade nuclear para Cdk4 e espessura do tumor.

Espessura do tumor (mm)	Cdk4 nuclear [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
≤ 1,0	40 (64,5)	22 (35,5)	62 (50,0)
> 1,0	15 (24,2)	47 (75,8)	62 (50,0)
TOTAL	55 (44,4)	69 (55,6)	124 (100,0)

Tabela 12 - Distribuição dos 124 casos de melanomas primários analisados de acordo com a positividade citoplasmática para Cdk4 e espessura do tumor.

Espessura do tumor (mm)	Cdk4 citoplasmática [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
≤ 1,0	13 (21,0)	49 (79,0)	62 (50,0)
> 1,0	23 (37,1)	39 (62,9)	62 (50,0)
TOTAL	36 (29,0)	88 (71,0)	124 (100,0)

pRb

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a espessura do tumor primário e a expressão de pRb ($p = 0,562$). Os melanomas com espessura menor ou igual a 1,0mm apresentaram positividade de 33,9% e os melanomas com espessura acima de 1,0mm de 29,0% (Tabela 13).

Tabela 13 - Distribuição dos 124 casos de melanomas primários analisados de acordo com a positividade para pRb e espessura do tumor.

Espessura do tumor (mm)	pRb [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
≤ 1,0	41 (66,1)	21 (33,9)	62 (50,0)
> 1,0	44 (71,0)	18 (29,0)	62 (50,0)
TOTAL	85 (68,5)	39 (31,5)	124 (100,0)

p53

A expressão de p53 nos tumores primários mostrou associação estatisticamente significativa com a espessura do tumor ($p < 0,001$). Os melanomas com espessura menor ou igual a 1,0mm apresentaram positividade de 15,9% e os melanomas com espessura acima de 1,0mm de 50,0% (Tabela 14).

Tabela 14 - Distribuição dos 125 casos de melanomas primários analisados de acordo com a positividade para p53 e espessura do tumor.

Espessura do tumor (mm)	p53 [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
≤ 1,0	53 (84,1)	10 (15,9)	63 (50,4)
> 1,0	31 (50,0)	31 (50,0)	62 (49,6)
TOTAL	84 (67,2)	41 (32,8)	125 (100,0)

p21

A expressão de p21 nos tumores primários mostrou associação estatisticamente significativa com a espessura do tumor ($p = 0,009$). Os melanomas com espessura menor ou igual a 1,0mm apresentaram positividade de 25,4% e os melanomas com espessura acima de 1,0mm de 47,7% (Tabela 15).

Tabela 15 - Distribuição dos 128 casos de melanomas primários analisados de acordo com a positividade para p21 e espessura do tumor.

Espessura do tumor (mm)	p21 [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
≤ 1,0	47 (74,6)	16 (25,4)	63 (49,2)
> 1,0	34 (52,3)	31 (47,7)	65 (50,8)
TOTAL	81 (63,3)	47 (36,7)	128 (100,0)

4.3 ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DOS MARCADORES BIOLÓGICOS E ULCERAÇÃO

Dos 116 tumores primários invasivos, 19 eram ulcerados (16,4%) e 97 não ulcerados (83,6%).

p16

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a presença ou não de ulceração no tumor primário invasivo e a expressão de p16 ($p = 1,0$). Todos os melanomas ulcerados foram negativos para p16 e os melanomas não ulcerados apresentaram positividade de 3,4% (Tabela 16).

Tabela 16 - Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p16 e presença de ulceração.

Ulceração	p16 [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
sim	17 (100,0)	-	17 (16,2)
não	85 (96,6)	3 (3,4)	88 (83,8)
TOTAL	102 (97,1)	3 (2,9)	105 (100,0)

Ciclina D1

A expressão de ciclina D1 não mostrou associação estatisticamente significativa com a presença ou não de ulceração na lesão primária dos tumores invasivos ($p = 0,069$). Todos os melanomas ulcerados foram

negativos para ciclina D1 e os melanomas não ulcerados apresentaram positividade de 17,8% (Tabela 17).

Tabela 17 - Distribuição dos 107 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para ciclina D1 e presença de ulceração.

Ulceração	Ciclina D1 [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
sim	17 (100,0)	-	17 (15,9)
não	74 (82,2)	16 (17,8)	90 (84,1)
TOTAL	91 (85,0)	16 (15,0)	107(100,0)

Cdk4

Tanto a expressão nuclear quanto a expressão citoplasmática de Cdk4 não mostrou associação estatisticamente significativa com a presença ou não de ulceração na lesão primária dos melanomas invasivos ($p = 0,275$ e $p = 0,969$, respectivamente). Os melanomas ulcerados apresentaram positividade nuclear e citoplasmática de 70,6%. Os melanomas não ulcerados apresentaram positividade nuclear de 56,3% e citoplasmática de 70,1% (Tabelas 18 e 19).

Tabela 18 - Distribuição dos 104 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade nuclear para Cdk4 e presença de ulceração.

Ulceração	Cdk4 nuclear [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
sim	5 (29,4)	12 (70,6)	17 (16,3)
não	38 (43,7)	49 (56,3)	87 (83,7)
TOTAL	43 (41,3)	61 (58,7)	104 (100,0)

Tabela 19 - Distribuição dos 104 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade citoplasmática para Cdk4 e presença de ulceração.

Ulceração	Cdk4 citoplasmática [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
sim	5 (29,4)	12 (70,6)	17 (16,3)
não	26 (29,9)	61 (70,1)	87 (83,7)
TOTAL	31 (29,8)	73 (70,2)	104 (100,0)

pRb

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a presença ou não de ulceração no tumor primário invasivo e a expressão de pRb ($p = 0,569$). Os melanomas ulcerados apresentaram positividade de 35,3% e os melanomas não ulcerados de 28,4% (Tabela 20)

Tabela 20 - Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para pRb e presença de ulceração.

	pRb [número de casos / (%)]		
Ulceração	Negativos	Positivos	TOTAL
sim	11 (64,7)	6 (35,3)	17 (16,2)
não	63 (71,6)	25 (28,4)	88 (83,8)
TOTAL	74 (70,5)	31 (29,5)	105 (100,0)

p53

A expressão de p53 nos tumores primários não mostrou associação estatisticamente significativa com a presença ou não de ulceração na lesão primária dos melanomas invasivos ($p = 0,308$). Os melanomas ulcerados apresentaram positividade de 47,1% e os melanomas não ulcerados de 34,1% (Tabela 21).

Tabela 21 - Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p53 e presença de ulceração.

	p53 [número de casos / (%)]		
Ulceração	Negativos	Positivos	TOTAL
sim	9 (52,9)	8 (47,1)	17 (16,2)
não	58 (65,9)	30 (34,1)	88 (83,8)
TOTAL	67 (63,8)	38 (36,2)	105 (100,0)

p21

A expressão de p21 nos tumores primários invasivos não mostrou associação estatisticamente significativa com a presença ou não de ulceração ($p = 1,0$). Tanto os melanomas ulcerados quanto os melanomas não ulcerados apresentaram positividade para p21 de 38,9% (Tabela 22).

Tabela 22 - Distribuição dos 108 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p21 e presença de ulceração.

Ulceração	p21 [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
sim	11 (61,1)	7 (38,9)	18 (16,7)
não	55 (61,1)	35 (38,9)	90 (83,3)
TOTAL	66 (61,1)	42 (38,9)	108 (100,0)

4.4 ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DOS MARCADORES BIOLÓGICOS E REGRESSÃO

Dos 116 melanomas primários invasivos, 23 mostraram regressão (19,8%) e 93 não apresentaram esta característica histológica (80,2%).

p16

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a presença ou não de regressão no tumor primário invasivo e a expressão de

p16 ($p = 1,0$). Todos os melanomas com regressão foram negativos para p16 e os melanomas sem regressão apresentaram positividade de 3,5% (Tabela 23).

Tabela 23 - Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p16 e presença de regressão.

	p16 [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
Regressão			
sim	20 (100,0)	-	20 (19,0)
não	82 (96,5)	3 (3,5)	85 (81,0)
TOTAL	102 (97,1)	3 (2,9)	105 (100,0)

Ciclina D1

A expressão de ciclina D1 não mostrou associação estatisticamente significativa com a presença ou não de regressão na lesão primária dos tumores invasivos ($p = 0,494$). Os melanomas com regressão apresentaram positividade para ciclina D1 de 20,0% e os melanomas sem regressão de 13,8% (Tabela 24).

Tabela 24 - Distribuição dos 107 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para ciclina D1 e presença de regressão.

	Ciclina D1 [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
Regressão			
sim	16 (80,0)	4 (20,0)	20 (18,7)
não	75 (86,2)	12 (13,8)	87 (81,3)
TOTAL	91 (85,0)	14 (15,0)	107(100,0)

Cdk4

Tanto a expressão nuclear quanto a expressão citoplasmática de Cdk4 não mostrou associação estatisticamente significativa com a presença ou não de regressão na lesão primária dos melanomas invasivos ($p = 0,659$ e $p = 0,195$, respectivamente). Os melanomas com regressão apresentaram positividade nuclear de 63,2% e citoplasmática de 57,9%. Os melanomas sem regressão apresentaram positividade nuclear de 57,6% e citoplasmática de 72,9% (Tabelas 25 e 26).

Tabela 25 - Distribuição dos 104 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade nuclear para Cdk4 e presença de regressão.

Regressão	Cdk4 nuclear [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
sim	7 (36,8)	12 (63,2)	19 (18,3)
não	36 (42,4)	49 (57,6)	85 (81,7)
TOTAL	43 (41,3)	61 (58,7)	104 (100,0)

Tabela 26 - Distribuição dos 104 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade citoplasmática para Cdk4 e presença de regressão.

Regressão	Cdk4 citoplasmática [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
sim	8 (42,1)	11 (57,9)	19 (18,3)
não	23 (27,1)	62 (72,9)	85 (81,7)
TOTAL	31 (29,8)	73 (70,2)	104 (100,0)

pRb

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a presença ou não de regressão no tumor primário invasivo e a expressão de pRb ($p = 0,959$). Os melanomas com regressão apresentaram positividade de 30,0% e os melanomas sem regressão de 29,4% (Tabela 27).

Tabela 27 - Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para pRb e presença de regressão.

Regressão	pRb [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
sim	14 (70,0)	6 (30,0)	20 (19,0)
não	60 (70,6)	25 (29,4)	85 (81,0)
TOTAL	74 (70,5)	31 (29,5)	105 (100,0)

p53

A expressão de p53 nos tumores primários invasivos não mostrou associação estatisticamente significativa com a presença ou não de regressão na lesão primária ($p = 0,322$). Os melanomas com regressão apresentaram positividade de 26,3% e os melanomas sem regressão de 38,4% (Tabela 28).

Tabela 28 - Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p53 e presença de regressão.

	p53 [número de casos / (%)]		
Regressão	Negativos	Positivos	TOTAL
sim	14 (73,7)	5 (26,3)	19 (18,1)
não	53 (61,6)	33 (38,4)	86 (81,9)
TOTAL	67 (63,8)	38 (36,2)	105 (100,0)

p21

A expressão de p21 nos tumores primários invasivos não mostrou associação estatisticamente significativa com a presença ou não de regressão ($p = 0,280$). Os melanomas com regressão apresentaram positividade para p21 de 28,6% e os melanomas sem regressão de 41,4% (Tabela 29).

Tabela 29 - Distribuição dos 108 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p21 e presença de regressão.

	p21 [número de casos / (%)]		
Regressão	Negativos	Positivos	TOTAL
sim	15 (71,4)	7 (38,9)	21 (19,4)
não	51 (58,6)	36 (41,4)	87 (80,6)
TOTAL	66 (61,1)	42 (38,9)	108 (100,0)

4.5 ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DOS MARCADORES BIOLÓGICOS E ÍNDICE MITÓTICO (IM)

Dos 116 melanomas primários invasivos estudados, o índice mitótico foi de zero em 33 casos de (28,4%), de 1 a 6 em 61 casos (52,6%) e maior que 6 em 22 casos (19,0%)

p16

Os 3 tumores primários invasivos positivos para p16 apresentaram índice mitótico menor ou igual a 6. Todos os casos com $IM > 6$ foram negativos para p16. Não foi possível a análise pelo teste de associação qui-quadrado ou teste exato de Fisher, pois mais de uma das frequências esperadas foi menor que 5 e a tabela formada não correspondia a uma tabela 2X2 (Tabela 30). Quando agrupados em melanomas com IM de 0 ou IM maior ou igual a 1, não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a expressão de p16 e o IM ($p= 1,000$). Os melanomas com IM de zero apresentaram positividade de 3,6% e os melanomas com $IM \geq 1$ de 2,6%.

Tabela 30 - Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p16 e índice mitótico (IM).

IM	p16 [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
0	27 (96,4)	1 (3,6)	28 (26,7)
1 - 6	55 (96,5)	2 (3,5)	57 (54,3)
> 6	20 (100)	-	20 (19,0)
TOTAL	102 (97,1)	3 (2,9)	105(100,0)

Ciclina D1

Apenas 1 caso com IM > 6 foi positivo para ciclina D1 (4,8%). Os melanomas com IM de zero apresentaram positividade de 27,6% e os melanomas com IM de 1-6 de 12,3%. Não foi possível a análise pelo teste de associação qui-quadrado ou teste exato de Fisher, pois mais de uma das frequências esperadas foi menor que 5 e a tabela formada não correspondia a uma tabela 2X2 (Tabela 31). Quando agrupados em melanomas com IM de 0 ou IM maior ou igual a 1, foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a expressão de ciclina D1 e o IM ($p= 0,025$). Os melanomas com IM de zero apresentaram positividade de 27,6% e os melanomas com IM ≥ 1 de 10,3% (Tabela 32).

Tabela 31 - Distribuição dos 107 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para ciclina D1 e índice mitótico (IM).

IM	Ciclina D1 [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
0	21 (72,4)	8 (27,6)	29 (27,1)
1 - 6	50 (87,7)	7 (12,3)	57 (53,3)
> 6	20 (95,2)	1 (4,8)	21 (19,6)
TOTAL	91 (85,0)	16 (15,0)	107(100,0)

Tabela 32 - Distribuição dos 107 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para ciclina D1 e índice mitótico (IM) negativo ou positivo.

IM	Ciclina D1 [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
0	21 (72,4)	8 (27,6)	29 (27,1)
≥1	70 (89,7)	8 (10,3)	78 (72,9)
TOTAL	91 (85,0)	16 (15,0)	107(100,0)

Cdk4

Tanto a expressão nuclear quanto a expressão citoplasmática de Cdk4 não mostrou associação estatisticamente significativa o índice mitótico da lesão primária ($p = 0,290$ e $p = 0,498$, respectivamente). Os melanomas com IM de zero apresentaram positividade nuclear de 46,4% e citoplasmática de 64,3%. Os melanomas com IM de 1-6 apresentaram positividade nuclear de 64,3% e citoplasmática de 69,6%. Os casos com IM

> 6 apresentaram positividade nuclear de 60,0% e citoplasmática de 80,0% (Tabelas 33 e 34).

Tabela 33 - Distribuição dos 104 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade nuclear para Cdk4 e índice mitótico (IM).

IM	CDK 4 nuclear [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
0	15 (53,6)	13 (46,4)	28 (26,9)
1 - 6	20 (35,7)	36 (64,3)	56 (53,8)
> 6	8 (40,0)	12 (60,0)	20 (19,2)
TOTAL	43 (41,35)	61 (58,7)	105 (100,0)

Tabela 34 - Distribuição dos 104 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade citoplasmática para Cdk4 e índice mitótico (IM).

IM	CDK 4 citoplasmática [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
0	10 (35,7)	18 (64,3)	28 (26,9)
1 - 6	17 (30,4)	39 (69,6)	56 (53,8)
> 6	4 (20,00)	16 (80,0)	20 (19,2)
TOTAL	31 (29,8)	73 (70,2)	105 (100,0)

pRb

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o índice mitótico do tumor primário e a expressão de pRb ($p = 0,500$). Os melanomas com IM de zero apresentaram positividade de 32,1% , os

melanomas com IM de 1-6 de 25,0% e os casos com IM > 6 apresentaram positividade de 38,1% (Tabela 35).

Tabela 35 - Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para pRb e índice mitótico (IM).

IM	pRb [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
0	19 (67,9)	9 (32,1)	28 (26,7)
1 - 6	42 (75,0)	14 (25,0)	56 (53,3)
> 6	13 (61,9)	8 (38,1)	21(20,0)
TOTAL	74 (70,5)	31 (29,5)	105 (100,0)

p53

A expressão de p53 nos tumores primários mostrou associação estatisticamente significativa com o índice mitótico descrito na lesão primária ($p = 0,001$). Os melanomas com IM de zero apresentaram positividade de 25,0% , os melanomas com IM de 1-6 de 28,6% e os casos com IM > 6 apresentaram positividade de 71,4% (Tabela 36).

Tabela 36 - Distribuição dos 105 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p53 e índice mitótico (IM).

	p53 [número de casos / (%)]		
IM	Negativos	Positivos	TOTAL
0	21 (75,0)	7 (25,0)	28 (26,7)
1 - 6	40 (71,4)	16 (28,6)	56 (53,3)
> 6	6 (28,6)	15 (71,4)	21(20,0)
TOTAL	67 (63,8)	38 (36,2)	105 (100,0)

p21

A expressão de p21 nos tumores primários invasivos não mostrou associação estatisticamente significativa com índice mitótico descrito na lesão ($p = 0,408$). Os melanomas com IM de zero apresentaram positividade de 31,0% , os melanomas com IM de 1-6 de 39,0% e os casos com IM > 6 apresentaram positividade de 50,0% (Tabela 37).

Tabela 37 - Distribuição dos 108 casos de melanomas primários invasivos analisados de acordo com a positividade para p21 e índice mitótico (IM).

	p21 [número de casos / (%)]		
IM	Negativos	Positivos	TOTAL
0	20 (69,0)	9 (31,0)	29 (26,9)
1 - 6	36 (61,0)	23 (39,0)	59 (54,6)
> 6	10 (50,0)	10 (50,0)	20 (18,5)
TOTAL	66 (61,1)	42 (38,9)	108(100,0)

4.6 TUMOR METASTÁTICO

Em análise preliminar da expressão dos marcadores estudados nos diferentes tipos de metástases, verificou-se a necessidade do agrupamento em metástases cutâneas e não cutâneas, incluindo-se neste último grupo, as metástases linfonodais e pulmonares.

p16

Todos os tumores metastáticos foram negativos para p16. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a expressão de p16 nos tumores primários quando comparados aos tumores metastáticos ($p=0,584$), como mostra a Tabela 38. Quando comparado o tumor primário à sua metástase cutânea correspondente ou à sua metástase linfonodal, verificou-se que a expressão de p16 foi exatamente a mesma nos dois grupos.

Tabela 38 - Distribuição dos melanomas primários e metastáticos de acordo com a expressão de p16.

Tumor	p16 [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
primário	105 (95,5)	5 (4,5)	110 (79,1)
metastático	29 (100,0)	-	29 (20,9)
TOTAL	134 (96,4)	5 (3,6)	139 (100,0)

Ciclina D1

Comparando-se a expressão de ciclina D1 entre os diferentes tipos de metástases, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,448$). Também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na comparação da expressão de ciclina D1 entre tumores primários e metastáticos ($p= 0,076$), como mostra a Tabela 39. Quando comparado o tumor primário à sua metástase cutânea correspondente ou à sua metástase linfonodal, verificou-se que a expressão de ciclina D1 foi exatamente a mesma nos dois grupos.

Tabela 39 - Distribuição dos melanomas primários e metastáticos de acordo com a expressão de ciclina D1.

Tumor	Ciclina D1 [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
primário	89 (81,7)	20 (18,3)	109 (79,0)
metastático	28 (96,6)	1 (4,8)	29 (21,0)
TOTAL	117 (84,8)	21 (15,2)	138 (100,0)

Cdk4

Tanto a expressão nuclear quanto a expressão citoplasmática de Cdk4 não mostrou diferença estatisticamente significativa nos diferentes grupos de metástases ($p= 0,379$ e $p= 0,774$, respectivamente). Quando comparados os tumores primários com os tumores metastáticos, a expressão nuclear de Cdk4 não apresentou diferença estatisticamente

significativa ($p= 0,449$), ao contrário da expressão citoplasmática que foi significativamente mais positiva nos tumores primários ($p= 0,003$), como mostram as Tabelas 40 e 41. Quando comparados os pares de tumor primário e metástase cutânea não foi encontrada diferença estatisticamente significativa tanto na expressão nuclear quanto na expressão citoplasmática de Cdk4 ($p= 0,375$ e $p= 0,687$, respectivamente). O mesmo ocorreu na comparação dos pares de tumor primário e metástase linfonodal com $p= 0,500$ para a expressão nuclear e $p= 1,000$ para a expressão citoplasmática.

Tabela 40 - Distribuição dos melanomas primários e metastáticos de acordo com a expressão nuclear de Cdk4.

	Cdk4 nuclear [número de casos / (%)]		
Tumor	Negativos	Positivos	TOTAL
primário	52 (47,3)	58 (52,7)	110 (79,1)
metastático	16 (55,2)	13 (44,8)	29 (20,9)
TOTAL	68 (48,9)	71 (51,1)	139 (100,0)

Tabela 41 - Distribuição dos melanomas primários e metastáticos de acordo com a expressão citoplasmática de Cdk4.

	Cdk4 citoplasmática [número de casos / (%)]		
Tumor	Negativos	Positivos	TOTAL
primário	32 (29,1)	78 (70,9)	110 (79,1)
metastático	17 (58,6)	12 (41,4)	29 (20,9)
TOTAL	49 (35,3)	90 (64,7)	139 (100,0)

pRb

A expressão de pRb não mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparados os diferentes grupos de metástases ($p=0,183$). Comparando-se a expressão de pRb nos tumores primários e metastáticos não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p=0,280$) (Tabela 42). Os pares de tumor primário e metástase cutânea ou metástase linfonodal não apresentaram diferença estatisticamente significativa na expressão de pRb ($p=0,375$ e $p=1,000$, respectivamente).

Tabela 42 - Distribuição dos melanomas primários e metastáticos de acordo com a expressão de pRb.

Tumor	pRb [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
primário	72 (69,1)	34 (30,9)	110 (79,1)
metastático	23 (79,3)	6 (20,7)	29 (20,9)
TOTAL	99 (71,2)	40 (28,8)	139 (100,0)

p53

Os diferentes grupos de metástases não apresentaram diferença na expressão de p53 ($p=0,534$). Os melanomas metastáticos não mostraram diferença estatisticamente significativa na expressão de p53 quando comparados aos melanomas primários ($p=0,131$), como mostra a Tabela 43. Os pares de tumor primário e metástase cutânea ou metástase linfonodal

não apresentaram diferença estatisticamente significativa na expressão de p53 ($p= 1,000$ em ambos os casos).

Tabela 43 - Distribuição dos melanomas primários e metastáticos de acordo com a expressão de p53.

Tumor	p53 [número de casos / (%)]		
	Negativos	Positivos	TOTAL
primário	77(70,0)	33 (30,0)	110 (79,1)
metastático	16 (55,2)	13 (44,8)	29 (20,9)
TOTAL	93 (66,9)	46 (33,1)	139 (100,0)

p21

As metástases cutâneas apresentaram maior positividade para p21 quando comparadas às metástases não cutâneas (linfonodais e pulmonares) ($p= 0,016$), como mostra a Tabela 44. Comparando-se a expressão de p21 nos tumores primários e metastáticos não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p= 0,883$) (Tabela 45). Quando comparado o tumor primário à sua metástase cutânea correspondente ou à sua metástase linfonodal, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de p21 ($p= 1,000$ e $p= 0,500$, respectivamente).

Tabela 44 - Distribuição dos grupos de tumores metastáticos de acordo com a expressão de p21.

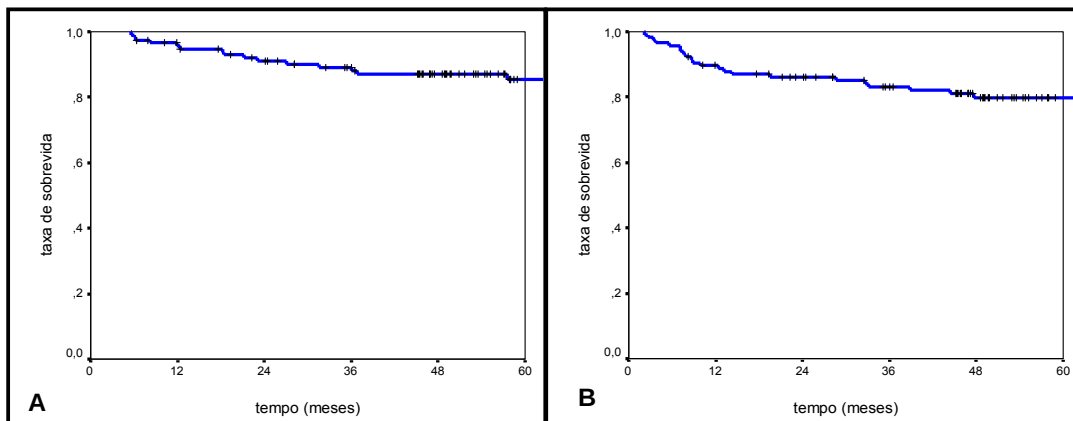
	p21 [número de casos / (%)]		
Metástase	Negativos	Positivos	TOTAL
cutânea	5 (38,5)	8 (61,5)	13 (44,8)
não cutânea	14 (87,5)	2 (12,5%)	16 (55,2)
TOTAL	19 (65,5)	10 (34,5)	29 (100,0)

Tabela 45 - Distribuição dos melanomas primários e metastáticos de acordo com a expressão de p21.

	p21 [número de casos / (%)]		
Tumor	Negativos	Positivos	TOTAL
primário	75(67,0)	37 (33,0)	112 (79,4)
metastático	19 (65,5)	10 (34,5)	29 (20,6)
TOTAL	94 (66,7)	47 (33,3)	141(100,0)

4.7 SOBREVIDA GLOBAL E LIVRE DE DOENÇA

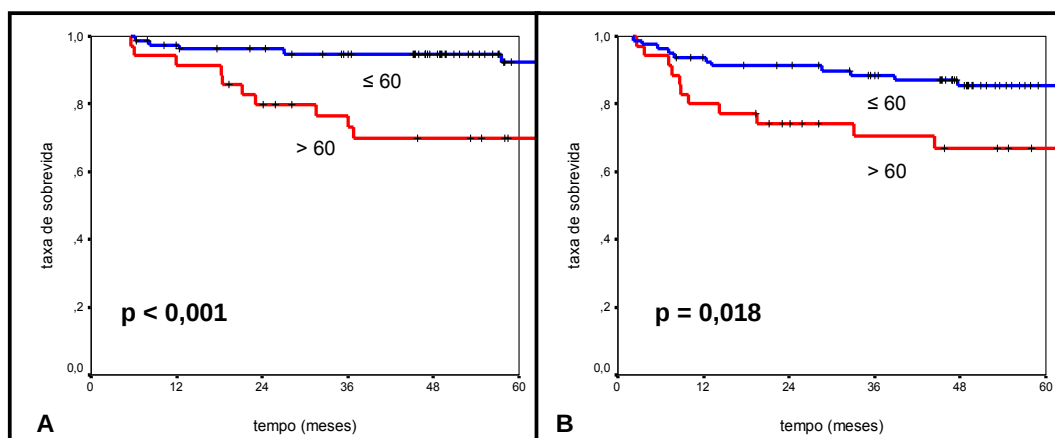
A sobrevida global em 2 anos dos 116 pacientes com melanoma invasivo analisados foi de 91,08% e em 5 anos de 85,58% (Figura 16A). A sobrevida livre de doença destes pacientes em 2 anos foi de 86,06% e em 5 anos de 79,78% (Figura 16B). A nossa amostra não apresentou diferença na sobrevida global ou livre de doença em relação ao sexo ($p = 0,338$; $p = 0,388$, respectivamente), localização da lesão primária ($p = 0,123$; $p = 0,393$, respectivamente) ou à presença de regressão no tumor ($p = 0,723$; $p = 0,883$, respectivamente).



Legenda: A) sobrevivida global B) sobrevivida livre de doença.

Figura 16 - Curvas de sobrevivida dos 116 pacientes com melanoma invasivo.

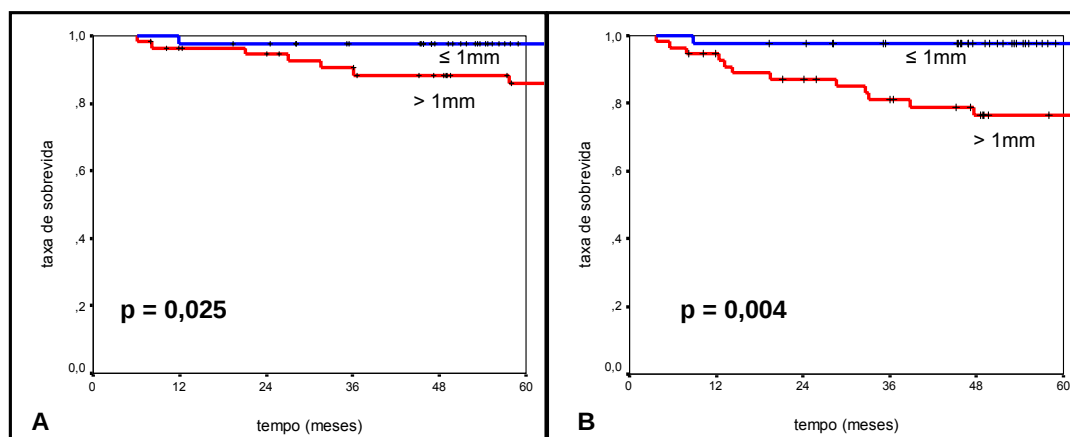
Os pacientes com idade menor ou igual a 60 anos apresentaram sobrevivida global em 5 anos de 92,45% e sobrevivida livre de doença em 5 anos de 85,33%. Os pacientes acima de 60 anos mostraram sobrevivida global em 5 anos de 69,83% e sobrevivida livre de doença em 5 anos de 66,76%. A diferença foi estatisticamente significativa, tanto para sobrevivida global quanto para livre de doença ($p < 0,001$ e $p = 0,018$, respectivamente), como mostra a Figura 17.



Legenda: A) sobrevivida global B) sobrevivida livre de doença.

Figura 17 - Curvas de sobrevivida dos 116 pacientes com melanoma invasivo, segundo idade.

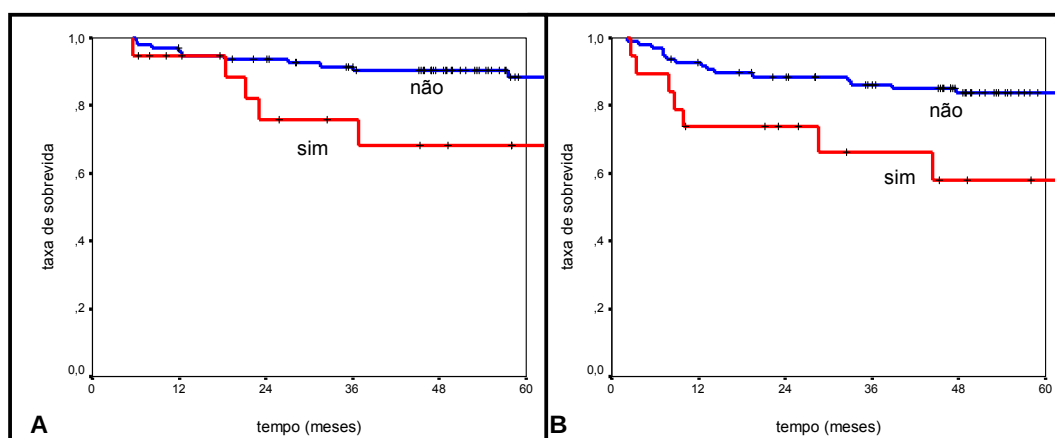
Os melanomas finos apresentaram sobrevida global em 5 anos de 97,73% e sobrevida livre de doença em 5 anos de 97,73%. Nos melanomas com espessura maior que 1,0mm a sobrevida global em 5 anos foi de 85,87% e a livre de doença no mesmo período de 76,61%. A diferença nas taxas de sobrevida global e livre de doença, segundo a espessura do tumor, foi estatisticamente significativa ($p = 0,025$ e $p = 0,004$, respectivamente), como mostra a Figura 18.



Legenda: A) sobrevida global B) sobrevida livre de doença.

Figura 18 - Curvas de sobrevida dos 116 pacientes com melanoma invasivo, segundo espessura do tumor.

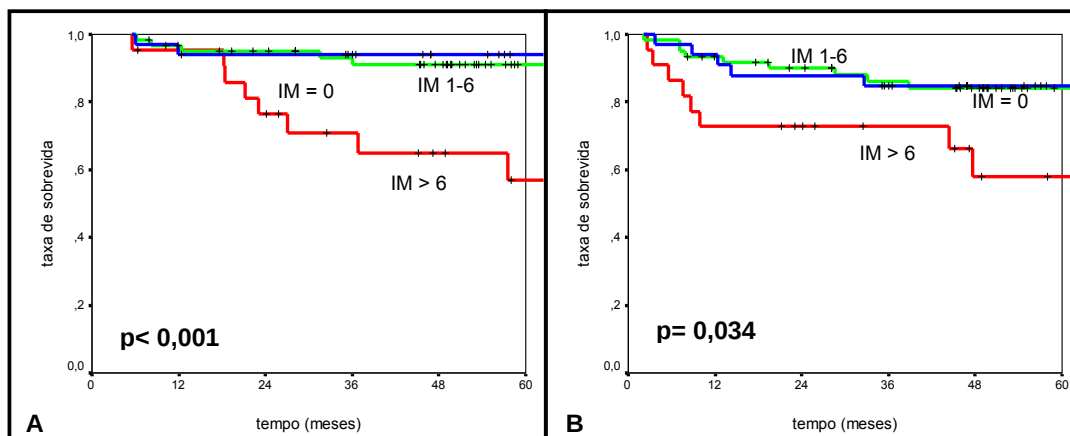
Os melanomas não ulcerados apresentaram sobrevida global em 5 anos de 88,54% e sobrevida livre de doença no mesmo período de 83,64%. Os melanomas ulcerados mostraram sobrevida global em 5 anos de 68,21% e sobrevida livre de doença em 5 anos de 58,03%. A diferença nas taxas de sobrevida foi estatisticamente significativa ($p = 0,010$ e $p = 0,011$), como mostra a Figura 19.



Legenda: A) sobrevida global B) sobrevida livre de doença.

Figura 19 - Curvas de sobrevida dos 116 pacientes com melanoma invasivo, segundo presença de ulceração.

Os pacientes que tinham lesão primária com IM de zero mostraram sobrevida global em 5 anos de 93,94% e sobrevida livre de doença em 5 anos de 84,85%. Os pacientes com IM de 1 a 6 mostraram sobrevida global em 5 anos de 91,09% e livre de doença de 84,05% e os pacientes com IM maior que 6 de 56,88% e 57,85%, respectivamente. A diferença nas taxas de sobrevida encontradas para os diferentes IM foi estatisticamente significativa com $p < 0,001$ para a sobrevida global e $p = 0,034$ para a sobrevida livre de doença. (Figura 20).

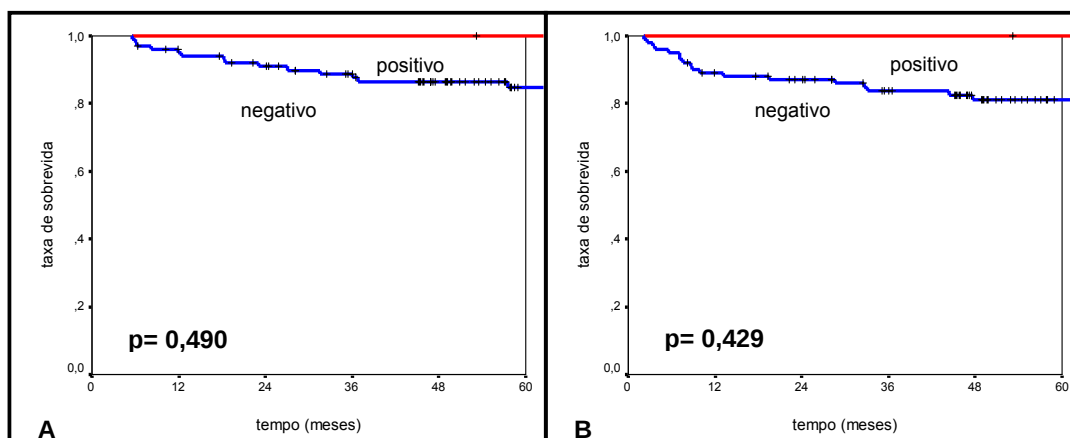


Legenda: **A)** sobrevivida global **B)** sobrevivida livre de doença.

Figura 20 - Curvas de sobrevivida dos 116 pacientes com melanoma invasivo, segundo o índice mitótico (IM).

p16

Os melanomas invasivos positivos para p16 (apenas 3 casos) mostraram sobrevivida global e livre de doença em 5 anos de 100%. Os pacientes negativos para p16 apresentaram sobrevivida global em 5 anos de 84,68% e livre de doença de 81,10%. A diferença nas taxas de sobrevivida global e livre de doença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,490$; $p = 0,429$, respectivamente), como mostra a Figura 21.



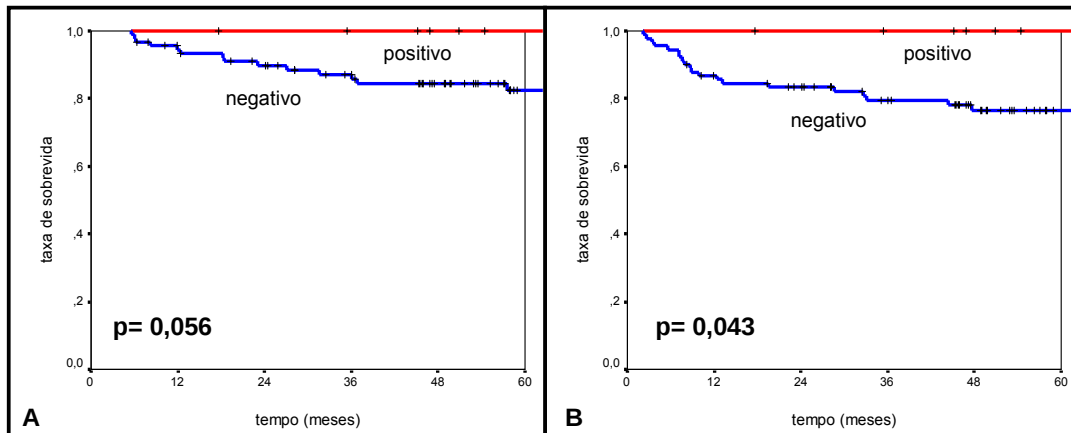
Legenda: A) sobrevida global B) sobrevida livre de doença.

Figura 21 - Curvas de sobrevida dos pacientes com melanoma invasivo, segundo expressão de p16.

Ciclina D1

Os melanomas primários invasivos com positividade para ciclina D1 apresentaram sobrevida global em 5 anos de 100% e os casos negativos de 82,55%, diferença que não se mostrou estatisticamente significativa ($p=0,056$). Em relação à sobrevida livre de doença em 5 anos, esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,043$). Nos melanomas primários invasivos com positividade para ciclina D1 a sobrevida livre de doença em 5 anos foi de 100% e nos casos negativos foi de 76,51% (Figura 22). Quando a comparação da sobrevida livre de doença em relação à expressão de ciclina D1 foi feita em separado para os melanomas finos e melanomas acima de 1,0mm, a diferença deixou de ser estatisticamente significativa. Nos melanomas finos, os pacientes positivos para ciclina D1 mostraram sobrevida livre de doença em 5 anos de 100% e os negativos de 96,77% ($p=$

0,570). Nos melanomas acima de 1,0mm os pacientes positivos para ciclina D1 apresentaram sobrevida livre de doença em 5 anos de 100% e os negativos de 65,98% ($p= 0,139$).



Legenda: A) sobrevida global B) sobrevida livre de doença.

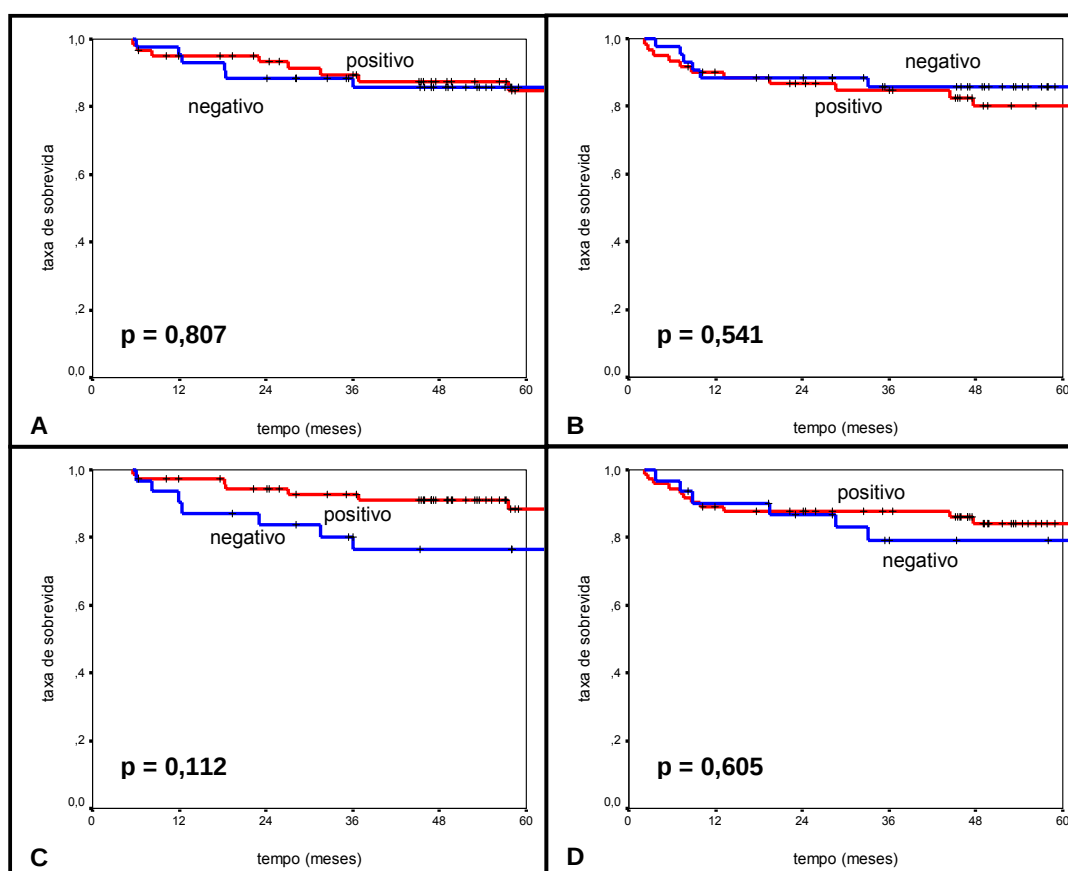
Figura 22 - Curvas de sobrevida dos pacientes com melanoma invasivo, segundo expressão de ciclina D1.

Cdk4

Os melanomas invasivos com positividade nuclear para Cdk4 mostraram sobrevida global em 5 anos de 84,86% e sobrevida livre de doença de 80,21%. Os casos negativos para expressão nuclear de Cdk4 apresentaram sobrevida global em 5 anos de 85,61% e livre de doença de 85,77%. A diferença nas taxas de sobrevida global e livre de doença segundo a expressão nuclear de Cdk4 não foi estatisticamente significativa ($p= 0,807$ e $p= 0,541$, respectivamente) (Figuras 23A e 23B).

Os melanomas invasivos com positividade citoplasmática para Cdk4 mostraram sobrevida global em 5 anos de 88,47% e sobrevida livre de

doença de 84,02%. Os casos negativos para expressão citoplasmática de Cdk4 apresentaram sobrevida global em 5 anos de 76,44% e livre de doença de 79,20%. A diferença nas taxas de sobrevida global e livre de doença segundo a expressão citoplasmática de Cdk4 não foi estatisticamente significativa ($p = 0,112$ e $p = 0,605$, respectivamente) (Figuras 23C e 23D).

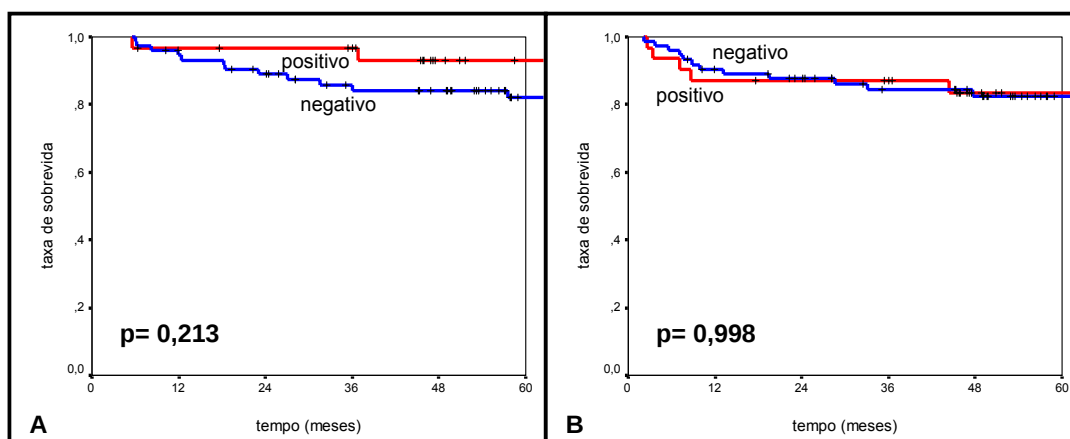


Legenda: Expressão nuclear: **A)** sobrevida global **B)** sobrevida livre de doença. Expressão citoplasmática: **C)** sobrevida global **D)** sobrevida livre de doença.

Figura 23 - Curvas de sobrevida dos pacientes com melanoma invasivo, segundo expressão de Cdk4.

pRb

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nas taxas de sobrevida global e livre de doença para os casos de melanoma invasivo, segundo a expressão de pRb ($p = 0,213$ e $p = 0,998$), como mostra a Figura 24. Os melanomas positivos para pRb apresentaram sobrevida global em 5 anos de 92,90% e livre de doença de 83,31%. Os melanomas negativos para pRb apresentaram sobrevida global em 5 anos de 81,98% e livre de doença de 82,58%.



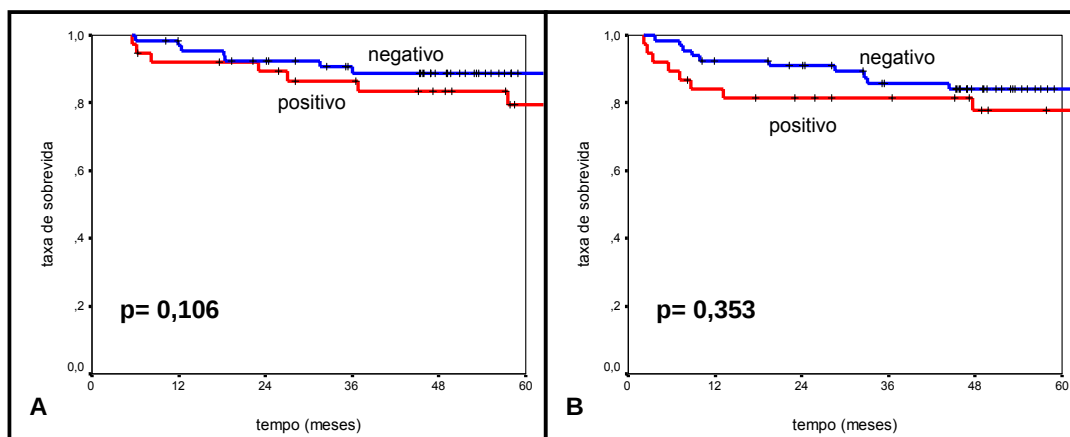
Legenda: A) sobrevida global B) sobrevida livre de doença.

Figura 24 - Curvas de sobrevida dos pacientes com melanoma invasivo, segundo expressão de pRb.

p53

A taxa de sobrevida global em 5 anos para os casos positivos para p53 foi de 79,49% e para os casos negativos de 88,89% ($p = 0,106$), como mostra a Figura 25A. A taxa de sobrevida livre de doença em 5 anos para os

melanomas positivos para p53 foi de 77,87% e para os melanomas negativos de 84,06% ($p = 0,353$), como mostra a Figura 25B.



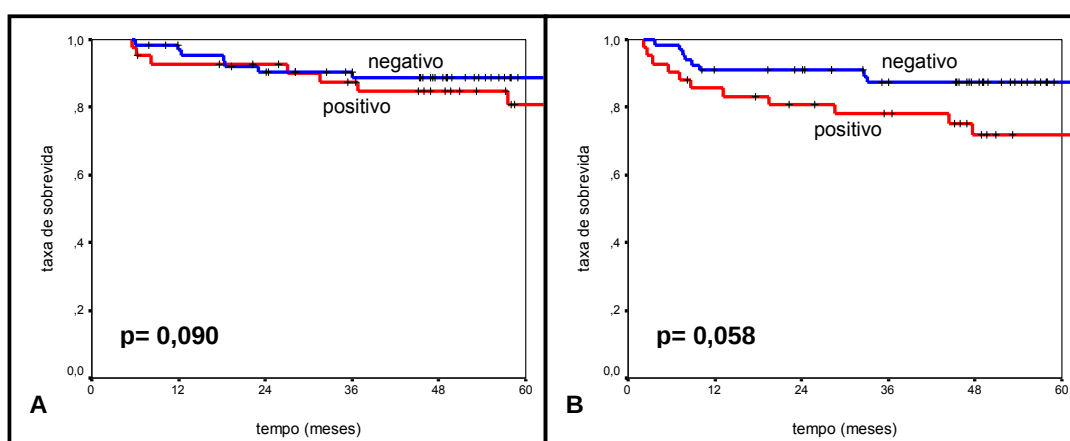
Legenda: A) sobrevivida global B) sobrevivida livre de doença.

Figura 25 - Curvas de sobrevivida dos pacientes com melanoma invasivo, segundo expressão de p53.

p21

Os melanomas invasivos com positividade para p21 mostraram sobrevivida global em 5 anos de 80,82% e sobrevivida livre de doença de 71,84%. Os casos negativos para p21 apresentaram sobrevivida global em 5 anos de 88,67% e livre de doença de 87,34%. A diferença nas taxas de sobrevivida global e livre de doença segundo a expressão nuclear de p21 não foi estatisticamente significativa ($p = 0,090$ e $p = 0,058$, respectivamente), como mostra a Figura 26. Quando a comparação da sobrevivida livre de doença em relação à expressão de p21 foi feita em separado para os melanomas finos e melanomas acima de 1,0mm, a diferença manteve-se

estatisticamente não significativa. Nos melanomas finos, os pacientes positivos para p21 mostraram sobrevida livre de doença em 5 anos de 100% e os negativos de 96,88% ($p= 0,557$). Nos melanomas acima de 1,0mm os pacientes positivos para p21 apresentaram sobrevida livre de doença em 5 anos de 61,29% e os negativos de 78,19% ($p= 0,171$).



Legenda: A) sobrevida global B) sobrevida livre de doença.

Figura 26 - Curvas de sobrevida dos pacientes com melanoma invasivo, segundo expressão de p21.

5 DISCUSSÃO

A variabilidade do comportamento biológico dos melanomas cutâneos é apenas parcialmente explicada por fatores clínicos e histológicos, sendo necessária a identificação de marcadores biológicos para a exata definição dos diferentes grupos de pacientes em relação à evolução da doença. Os eventos moleculares que determinam a gênese do melanoma cutâneo ainda não estão completamente esclarecidos. As vias que controlam o ciclo celular e apoptose são de fundamental importância na transformação maligna das células e determinação da agressividade de diversas neoplasias. Em sua fase de crescimento radial os melanomas podem apresentar deficiência da via p16/pRb, o que determinaria um ganho em sua capacidade proliferativa. Nesta fase sua sobrevivência depende da interação entre ceratinócitos e melanócitos (SVIDERSKAYA et al. 2003). Para o desenvolvimento de crescimento vertical e capacidade de produzir metástases seria necessária a perda desta interação e poderia ser adquirida através de alterações genéticas que determinariam a inibição da apoptose (SVIDERSKAYA et al. 2003). Deste modo, é também de grande importância o estudo da via p53 nos melanomas, incluindo o estudo da proteína p21.

O nosso estudo baseia-se na análise concomitante da expressão dos componentes das vias p16/pRb e p53 em melanomas extensivos superficiais.

Para a montagem do banco de dados, encontrou-se certa dificuldade na seleção dos pacientes, pois muitos casos acompanhados em nosso serviço não possuíam bloco da lesão primária disponível. Apesar disso, a amostragem é composta por melanomas extensivos superficiais que cobrem todo o espectro de distribuição dos melanomas cutâneos quanto à profundidade, principal fator determinante do comportamento biológico destes tumores. A amostragem neste estudo não revelou diferença em relação ao sexo e abrange ampla faixa etária (14 a 89 anos) e todos os estadios da doença. O tempo médio de acompanhamento foi ao redor de 5 anos (59,67 meses), com baixa taxa de perda de seguimento (10,3%).

A avaliação dos dados indica tratar-se de amostra que reproduz o comportamento biológico habitual encontrado na literatura para melanomas nos diversos estadios. Dentre estes dados, destacam-se as diferenças significativas da sobrevida global e livre de doença em relação à idade, espessura da neoplasia, ulceração e índice mitótico (BALCH et al. 2001a e b; AZZOLA et al. 2003; BUSAM 2004; FRANCKEN et al. 2004; BARNHILL et al. 2005; NAGORE et al. 2005). Embora vários trabalhos na literatura indiquem que o índice mitótico seja relevante na avaliação do prognóstico de melanomas, a falta de padronização na forma de contagem determinou que o estadiamento atual para melanomas não incluísse esta variável (BALCH CM et al. 2001a e b; AZZOLA et al. 2003; BUSAM 2004; FRANCKEN et al. 2004; BARNHILL et al. 2005; NAGORE et al. 2005). Nossos resultados favorecem a inclusão deste dado como fator prognóstico, ressaltando-se

que a profundidade de Breslow possa ter influenciado como fator preponderante no resultado estatístico.

O TMA proposto foi construído com sucesso, apresentando pequena perda de material, situação mais comumente vista nos melanomas mais finos (1,01 a 2,0mm), provavelmente por apresentarem menor volume de tumor disponível para amostragem.

Dentre as dificuldades encontradas na leitura das lâminas, destaca-se a grande quantidade de células carregadas de pigmento melânico em algumas amostras, o que poderia alterar a interpretação na análise imunoistoquímica. No entanto, a utilização de uma lâmina de controle negativo apenas incubada com BSA permitiu evidenciar claramente mudanças de intensidade na coloração imunoistoquímica. Além disto, como a maioria das proteínas era de expressão nuclear, a influência do pigmento melânico foi menos marcante.

A inclusão dos nevos melanocíticos no TMA foi proposta como controle interno da expressão dos marcadores biológicos, em tecido não neoplásico, e não com a finalidade de comparação com os melanomas estudados. Surpreendeu-nos a ausência de expressão destas proteínas, à exceção de Cdk4 citoplasmática em cinco nevos e Cdk4 nuclear e pRb em apenas uma amostra.

Via p16/pRb

Expressão de p16

A proteína p16 age como supressor de tumor inibindo a fosforilação de pRb ao ligar-se às ciclinas dependentes de quinase 4 e 6 (Cdk4 e 6). A disfunção desta proteína leva à ausência de inibição das Cdks, resultando em crescimento celular descontrolado, pela inativação de pRb, e subsequente desenvolvimento e progressão tumoral. É descrita também a participação de p16 na senescência de melanócitos normais, processo caracterizado pela perda da capacidade de proliferação após um número limitado de divisões (SVIDERSKAYA et al. 2003). A disfunção das proteínas responsáveis pela senescência celular seria o substrato através do qual as células escapariam deste processo programado, aumentando a probabilidade de transformação maligna (PIEPKORN 2000)

Neste estudo, praticamente todos os melanomas deixaram de expressar p16. Apenas cinco casos foram positivos, todos representando melanomas com espessura menor ou igual a 1,0 mm (2 melanomas *in situ* e 3 melanomas finos). Como a positividade para p16 foi muito baixa (4% dos tumores primários), a amostra não teve poder estatístico para evidenciar associação significativa com a espessura do tumor, ulceração, regressão e índice mitótico. Todos os melanomas acima de 1,0 mm foram negativos para p16, assim como todos os melanomas ulcerados, com regressão e com IM > 6.

A positividade de p16 em melanomas é descrita como variando de 20 a 90%, dependendo da metodologia e material utilizados (PAVEY et al. 2002). Diferentemente dos nossos dados, a maioria dos estudos mostra maior grau de positividade nos melanomas menos agressivos e perda de expressão p16 mais significativa nos melanomas mais profundos e nos tumores metastáticos (REED et al. 1995; FLORES et al. 1996; SPARROW et al. 1998; PAVEY et al. 2002; ALONSO et al. 2004; BACHMANN et al. 2004; ZHANG e ROSDAHL 2004, 2005). Desta forma, a tendência é considerar a perda de função de p16 como um evento tardio na transformação maligna dos melanócitos, relacionado à progressão e capacidade de invasão tumoral (REED et al. 1995; FLORES et al. 1996; SPARROW et al. 1998; PAVEY et al. 2002; ALONSO et al. 2004; BACHMANN et al. 2004; ZHANG e ROSDAHL 2004, 2005). A perda de expressão de p16 em nossos casos ocorreu precocemente, pois apenas 2 dos 20 melanomas *in situ* expressaram p16, mantendo a controvérsia já descrita na caracterização do momento da ocorrência da alteração desta proteína nos melanomas (PIEPKORN 2000).

Nenhum dos melanomas metastáticos apresentou expressão de p16, não havendo diferença em relação à expressão nos tumores primários. Apesar da perda de expressão de p16 ter sido um evento precoce na nossa amostra, este evento manteve-se presente em toda a evolução dos melanomas, desde os tumores primários mais agressivos até os tumores metastáticos. Não foi encontrada diferença entre a expressão de p16 no tumor e sua metástase correspondente. Considera-se que a perda ou

inativação de um dos alelos do gene codificador de p16 (CDKN2A) ocorra precocemente no desenvolvimento tumoral dos melanomas e o segundo alelo seria alterado ou perdido mais tardiamente, mantendo a disfunção da proteína em todos os estágios da doença (PIEPKORN 2000).

Os pacientes com melanomas invasivos que expressaram p16 (apenas 3 casos) mostraram sobrevida global e livre de doença em 5 anos de 100%. Da mesma forma que para as variáveis histológicas, o número de pacientes com positividade para p16 não conferiu poder estatístico para que a amostra identificasse diferenças nas taxas de sobrevida em relação à expressão deste marcador.

Expressão de ciclina D1

A ciclina D1, juntamente com as ciclinas D2 e D3, é a primeira a ser expressa na fase G1 do ciclo celular. Ao ligar-se à Cdk4, forma um complexo que leva à inativação de pRb através de sua fosforilação. Este processo permite que a célula prossiga para a fase S do ciclo celular, determinando sua proliferação. As ciclinas D funcionam como sensores de fatores de crescimento e estão ausentes em células quiescentes (PIEPKORN 2000). São proteínas lábeis, com meia-vida curta e competem com a proteína p16 na ligação com as Cdk4 (PIEPKORN 2000).

A ciclina D1, em nosso estudo, foi expressa em 16% dos tumores primários, estando significativamente mais expressa nos melanomas *in situ* e finos ($p=0,026$). Alguns estudos observaram que a expressão de ciclina D1

em melanomas extensivos superficiais primários varia de 53 a 67% dos casos, não havendo diferença em relação à espessura do tumor (FLORENES et al. 2000; GEORGIEVA et al. 2001). ALONSO et al. em 2004, porém, observaram maior expressão de ciclina D1 na fase radial dos melanomas primários, com diminuição da expressão na fase vertical, sugerindo papel da ciclina D1 nas fases iniciais do desenvolvimento do melanoma, ao contrário da proteína p16.

Não foi observada relação entre a expressão de ciclina D1 e a presença de ulceração ou regressão, mas todos os melanomas ulcerados foram negativos para ciclina D1. Os melanomas primários com IM ≥ 1 apresentaram menor positividade para ciclina D1 quando comparados aos melanomas com IM = 0 ($p = 0,025$), indicando uma relação inversa entre a presença de mitoses e a expressão de ciclina D1. Estes dados enfatizam a importância da ciclina D1 nos estágios iniciais do melanoma, não se relacionando, portanto, à progressão, invasão e agressividade do tumor.

A expressão de ciclina D1 nas metástases foi muito baixa (3,4%), ficando prejudicada a análise estatística. Pelo teste exato de Fisher, os tumores metastáticos não mostraram diferença na expressão de ciclina D1 em relação aos tumores primários ($p = 0,076$). Não houve diferença na expressão entre as diferentes localizações de metástases e também entre os tumores primários e suas respectivas metástases.

Os pacientes com melanomas positivos para ciclina D1 apresentaram sobrevida global e livre de doença em 5 anos de 100%. Apesar da sobrevida livre de doença ser maior nestes pacientes ($p = 0,043$), este dado não atingiu

significância estatística ao estudá-los separadamente quanto à espessura do tumor, evidenciando a importância da medida de Breslow como fator prognóstico nos melanomas cutâneos.

Expressão de Cdk4

A Cdk4 é uma das proteinoquinas atuantes na fase G1 do ciclo celular. Quando ligada à ciclina D1 leva a fosforilação e inativação de pRb, promovendo a proliferação celular. Em linhagens celulares de melanoma cutâneo é descrita mutação que produz proteína Cdk4 mais resistente à ligação com a proteína p16, dificultando a atuação deste supressor de tumor (PAVEY et al. 2002).

Observou-se neste estudo que 71% dos tumores primários apresentaram positividade citoplasmática para Cdk4 e 55,6% mostraram positividade nuclear. A Cdk4 é descrita como fortemente expressa em 58% dos melanomas (PIEPKORN 2000).

Tanto a expressão nuclear quanto a citoplasmática de Cdk4, neste estudo, não mostrou associação com ulceração, regressão ou índice mitótico. Os melanomas com espessura menor ou igual a 1,0 mm apresentaram maior expressão citoplasmática de Cdk4 ($p= 0,048$) e os melanomas com espessura acima de 1,0 mm apresentaram maior expressão nuclear ($p < 0,001$). Os nossos dados diferem dos descritos na literatura, que mostram maior expressão nuclear e citoplasmática de Cdk4 relacionada a melanomas finos e menos agressivos (BACHMANN et al.

2004). É descrita, ainda, associação entre a expressão aumentada de Cdk4 e maior expressão de ciclina D1 (MAELANDSMO et al.1996a), o que, em nosso experimento, ocorreu apenas quando se avaliou a expressão citoplasmática. Embora desconhecido o mecanismo, uma explicação para nossos achados estaria relacionada a uma compartimentalização do metabolismo da Cdk4, possivelmente iniciando sua produção no citoplasma seguida de transporte ao núcleo. Desta forma, os melanomas menos espessos expressariam em maior quantidade a proteína citoplasmática e posteriormente, com a aquisição de outras mutações nos melanomas mais espessos, com acúmulo de proteínas facilitadoras da sua produção ou desequilíbrio nas vias metabólicas envolvidas, haveria aumento da expressão nuclear de Cdk4.

Os tumores primários não mostraram diferença na expressão nuclear de Cdk4 em relação aos tumores metastáticos e sim na expressão citoplasmática que foi significativamente maior nos tumores primários ($p=0,003$). Não houve diferença na expressão de Cdk4 nos diferentes tipos de metástases ou entre os tumores primários e suas metástases correspondentes. GEORGIEVA et al. (2001) observaram expressão moderada de Cdk4 em melanomas, não havendo diferença entre tumores primários e metastáticos ou associação com a espessura do tumor.

A expressão de Cdk4 não mostrou impacto na sobrevida global ou livre de doença dos pacientes estudados.

Expressão de pRb

A proteína pRb é o ponto-chave no controle do ciclo celular durante a fase G1. Em seu estado não fosforilado inibe a progressão para a fase S do ciclo, recrutando o fator de transcrição E2F. Quando ocorre a sua fosforilação pela ação do complexo ciclina D / Cdk, a proteína pRb dissocia-se do fator de transcrição E2F e este pode, então, agir no núcleo da célula, sendo sua presença necessária para que ocorra a replicação do DNA. A inativação funcional de pRb pode ocorrer com aumento da expressão de Cdk4 ou ciclina D1 ou pela perda da função inibitória de p16 (PIEPKORN 2000).

Os melanomas primários estudados mostraram positividade nuclear de 31,4% para pRb, não havendo relação da expressão desta proteína com nenhuma das variáveis estudadas. Os tumores metastáticos apresentaram positividade de 20,7%. Não se observou diferença entre a expressão dos tumores primários quando comparados aos metastáticos. Também não houve diferença entre os diferentes tipos de metástases ou entre os tumores primários e respectivas metástases. Vários estudos mostram que a expressão de pRb está inalterada na maioria dos melanomas mostrando que a inativação de pRb é um evento raro no desenvolvimento destes tumores (MAELANDSMO et al. 1996a; PIEPKORN 2000).

A expressão de pRb não apresentou impacto na sobrevida global ou livre de doença dos pacientes estudados, estando de acordo com os dados encontrados por BACHMANN et al (2004).

Em suma, nossos dados indicam que a via p16 / pRb está alterada nas diversas fases de desenvolvimento do melanoma. Nos melanomas *in situ* e finos, predomina a expressão de ciclina D1 e Cdk4 citoplasmática com baixa expressão de p16, enquanto nos melanomas acima de 1,0 mm, predomina a expressão de Cdk4 nuclear, não havendo expressão de p16 (Figuras 27 e 28). Portanto, seja por perda da inibição exercida por p16, ou por alteração do complexo ciclina D1 / Cdk4, através do aumento da expressão de um de seus componentes, confere-se aos melanomas cutâneos aumento da atividade proliferativa por inativação funcional de pRb, mesmo que nossos dados não tenham evidenciado alteração marcante na sua expressão.

Via p53

Expressão de p53

A proteína p53 é responsável pela manutenção da estabilidade do genoma da célula. Na ocorrência de dano no DNA celular, p53 promove a parada do ciclo celular na fase G1 através da indução de p21. Quando não ocorre o reparo adequado do DNA, a proteína p53 induz apoptose celular, através da indução de proteínas envolvidas neste processo como, por exemplo, *Bax*. A proteína p53 normalmente está presente em pequenas quantidades nos tecidos normais, não detectáveis através de imunoistoquímica (HUSSEIN et al. 2003). A proteína p53 parece exercer papel na senescência de melanócitos deficientes em p16 (SVIDERSKAYA et al. 2003). A forma selvagem da proteína é de localização

predominantemente nuclear e age como supressora de tumor (HUSSEIN et al. 2003). A proteína p53 está frequentemente mutada em diversos tipos de células tumorais e estas mutações contribuem para a expansão clonal celular e instabilidade genômica (WU et al. 2004). Os mecanismos de inativação do gene codificador de p53 incluem diversas aberrações como mutações pontuais, deleções e inserções que produzem proteínas truncadas (BAE et al. 1996; SULAIMON e KITCHELL 2003). As taxas de mutações em melanomas são descritas como variando de 10 a 30% (SVIDERSKAYA et al. 2003).

Os melanomas primários neste estudo apresentaram positividade para p53 de 32,8%, sendo descrita na literatura expressão variando de 0 a 60% (HUSSEIN et al. 2003). A expressão de p53 foi maior nos melanomas acima de 1,0 mm ($p < 0,001$), estando em concordância com dados da literatura que definem a superexpressão de p53 com sendo um evento tardio na gênese dos melanomas e estando relacionada à progressão tumoral (PIEPKORN 2000; CZAJKOWSKI et al. 2002; HUSSEIN et al. 2003). A expressão de p53 não mostrou associação com ulceração ou regressão, porém foi significativa quando avaliado o IM, sendo a expressão maior nos casos com IM > 6 ($p = 0,001$). Este dado poderia significar que a expressão aumentada de p53 estivesse relacionada à maior agressividade do tumor ou que o índice mitótico estaria aumentado em função da perda de atividade de p53 na indução da apoptose. Porém, a expressão desta proteína não mostrou associação com sobrevida global ou livre de doença. Além disso, não houve diferença na expressão de p53 entre tumores primários e

metastáticos, entre as diferentes localizações de tumor metastático ou entre o tumor primário e sua respectiva metástase. KARJALAINEN et al. em 1999, observaram impacto da expressão de p53 na sobrevida livre de doença, mas não foi verificada relação com a espessura do tumor.

Expressão de p21

A proteína p21 inibe a proliferação celular bloqueando a atividade do complexo ciclina / Cdk ou ligando-se diretamente ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), inibindo a ação da enzima DNA polimerase. A ação de p21 está relacionada à sua ativação pela proteína p53, mas linhagens celulares de melanoma mostraram mecanismo de ativação desta proteína independente de p53 (KARJALAINEN et al. 1999; BEATTIE et al. 2005). Mutações no gene codificador de p21 são raras, tanto em melanomas familiares quanto em melanomas esporádicos (HUSSEIN et al. 2003). É descrito que a proteína p21 está presente tanto nos complexos Cdk ativos quanto nos inativos, dependendo a sua ação da quantidade de moléculas presentes no microambiente (MAELANDSMO et al. 1996b; CZAJKOWSKI et al. 2002). Várias moléculas são necessárias para a inativação das Cdk e pequenas quantidades de p21 podem funcionar como ativador destes complexos (MAELANDSMO et al. 1996b; CZAJKOWSKI et al. 2002). Estas características da proteína p21 determinam a heterogeneidade da expressão do seu gene codificador.

Encontrou-se, neste estudo, expressão de p21 em 37,7% dos tumores primários. A expressão de p21 é descrita como aumentada em melanomas avançados quando comparada com a expressão em lesões benignas (MAELANDSMO et al. 1996b; TROTTER et al. 1997; BALES et al. 1999).

Os melanomas acima de 1,0 mm apresentaram maior positividade para p21 do que os melanomas menos espessos ($p = 0,009$). Os dados descritos na literatura quanto à expressão de p21 e sua correlação com a espessura do tumor são conflitantes. MAELANDSMO et al. em 1996b, observaram maior expressão de p21 nos melanomas mais espessos. TROTTER et al. em 1997, não evidenciaram relação da expressão de p21 e espessura do tumor. KARJALAINEN et al. em 1999, verificaram o oposto, mostrando melanomas finos com maior expressão de p21.

A maior expressão de p21 em melanomas mais avançados pode ser induzida pela perda de expressão de outros inibidores de Cdks como, o p16, e reflete mecanismo de *feedback* usado pelas células tumorais para tentar controlar a proliferação celular (MAELANDSMO et al. 1996b). Esta observação está de acordo com os nossos dados que mostram maior expressão de p21 nos melanomas mais espessos quando estes não expressaram p16.

A expressão de p21, em nossa amostra, não apresentou associação com as outras variáveis estudadas (ulceração, regressão e IM).

Os melanomas primários não apresentaram diferença na expressão de p21 quando comparados aos tumores metastáticos. MAELANDSMO et al. em 1996b, observaram maior expressão nos tumores primários comparados

às metástases, sugerindo que a perda da expressão de p21 esteja relacionada com aquisição de fenótipo metastático. Em nosso estudo as metástases não mostraram diferença na expressão de p21 em relação ao tumor primário correspondente. Mas a expressão de p21 variou de acordo com o tipo de metástase estudada, onde as metástases cutâneas apresentaram maior positividade para p21 do que as metástases não cutâneas (linfonodais e pulmonares) ($p=0,016$).

A expressão de p21 em nosso estudo não apresentou relação com a sobrevida global ou livre de doença, dados concordantes com os observados por MAELANDSMO et al. em 1996b. KARJALAINEN et al. em 1999 verificaram menor expressão desta proteína com impacto na sobrevida livre de doença.

Os nossos resultados mostram que a via p53 também pode estar alterada nos melanomas cutâneos. A expressão aumentada de p21 nos melanomas mais espessos coincide com a maior expressão de p53, confirmando a relação entre estas duas proteínas (Figuras 27 e 28).

As vias p16 / pRb e p53 parecem ter ação combinada, observando-se que o aumento da expressão de p21 nos melanomas mais espessos pode estar relacionado à perda de expressão de p16 e aumento de expressão de Cdk4 nuclear, representando mecanismo de *feedback* na tentativa de controlar a proliferação celular (Figuras 27 e 28).

Parte das análises estatísticas relacionadas à expressão das proteínas nos pares de tumor primário e metastático e curvas de sobrevida global e livre de doença, foi prejudicada pelo número de pacientes que

muitas vezes não conferiu poder estatístico para que a amostra revelasse alterações nestes dados. Estudos futuros, com maior amostragem, poderão permitir melhor comparação dos dados.

Nosso estudo baseia-se na avaliação da expressão de proteínas através de imunoistoquímica, indicando presença ou não destas moléculas. No entanto, não reflete a condição do gene, do RNA mensageiro ou da proteína transcrita. Desta forma, os resultados desta pesquisa necessitariam ser confirmados através de estudos moleculares mais específicos.

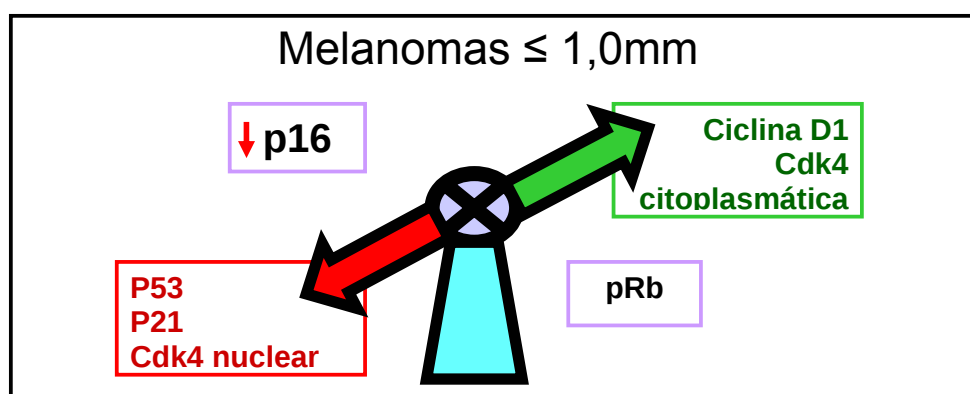


Figura 27 - Análise da expressão das vias p16/pRb e p53 em melanomas *in situ* e finos.

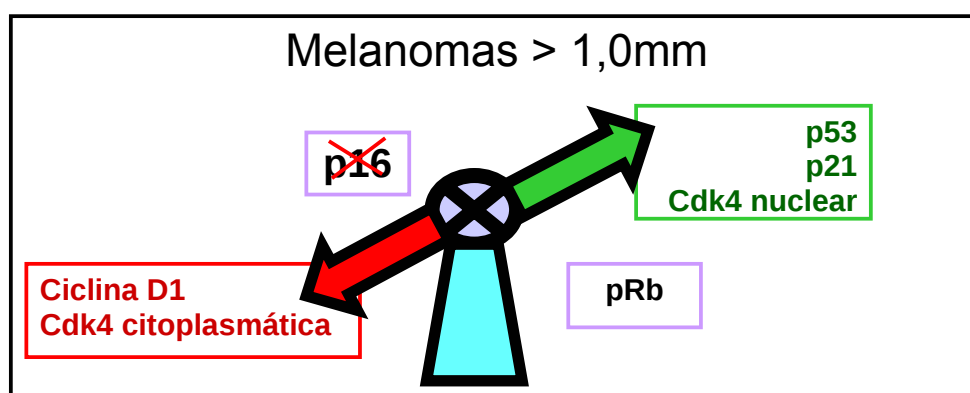


Figura 28 - Análise da expressão das vias p16/pRb e p53 em melanomas espessos.

6 CONCLUSÕES

1. O banco de dados criado parece reproduzir o comportamento biológico habitual encontrado na literatura para melanomas cutâneos extensivos superficiais nos diversos estádios da doença.
2. O *tissue microarray* proposto foi confeccionado com sucesso e permitiu a análise imunoistoquímica dos marcadores biológicos propostos e disponibiliza mais de 70 lâminas para estudos futuros.
3. A análise imunoistoquímica das proteínas da via p16/pRb e via p53 foi realizada na maioria dos pacientes incluídos no banco de dados e em todos os tumores metastáticos.

Análise da expressão dos marcadores em relação à espessura do tumor

1. Todos os melanomas acima de 1,0 mm perderam a expressão de p16. Nos melanomas *in situ* e finos a sua expressão foi muito baixa.
2. Os melanomas com espessura até 1,0 mm apresentaram maior expressão de ciclina D1 e Cdk4 citoplasmática.
3. Os melanomas com espessura acima de 1,0 mm apresentaram maior expressão de Cdk4 nuclear, p53 e p21.
4. A expressão de pRb não mostrou associação com a espessura do tumor.

Análise da expressão dos marcadores em relação à ulceração e regressão

1. As variáveis ulceração e regressão não mostraram associação com a expressão das proteínas estudadas.

Análise da expressão dos marcadores em relação ao índice mitótico

1. Os melanomas com IM ≥ 1 apresentaram menor expressão de ciclina D1. Os casos com IM > 6 apresentaram maior expressão de p53.

Análise comparativa da expressão dos marcadores entre tumores primários e metastáticos

1. Os tumores primários mostraram maior expressão de Cdk4 citoplasmática em relação aos tumores metastáticos.
2. As metástases cutâneas apresentaram maior expressão de p21 em relação ao grupo de metástases não cutâneas.

Análise de sobrevida global e livre de doença

1. A expressão das proteínas estudadas não mostrou impacto na sobrevida global ou livre de doença dos pacientes.

Considerações finais

1. A perda de expressão de p16 representou uma característica constante nos melanomas estudados.
2. A expressão de ciclina D1 pode estar relacionada às fases iniciais de transformação maligna dos melanócitos.
3. Os melanomas menos espessos expressariam em maior quantidade a proteína Cdk4 citoplasmática e com a aquisição de outras mutações nos melanomas mais espessos, haveria ganho de expressão nuclear.
4. A alteração na expressão da proteína pRb parece ter pouca influência no comportamento biológico e na gênese dos melanomas cutâneos.
5. A alteração da proteína p53 pode representar evento tardio na gênese dos melanomas
6. A expressão aumentada de p21 pode estar relacionada a mecanismo de *feedback* para o controle da proliferação celular nas células que deixam de expressar p16 ou incrementam a expressão de Cdk4 nuclear.
7. Em melanomas extensivos superficiais, mais de um componente das vias p16/pRb e p53 está alterado. As duas vias parecem ter ação combinada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Alizadeh AA, Ross DT, Perou CM, van de Rijn M. Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns. **J Pathol** 2001; 195:41-52.

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

An HX, Beckmann MW, Reifemberger G, Bender HG, Niederacher D. Gene amplification and overexpression of Cdk4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation. **Am J Pathol** 1999; 154:113-8.

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

Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF, et al. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. **Cancer** 2003; 97:1488-98.

Bae I, Smith ML, Sheikh MS, et al. An abnormality in the p53 pathway following gamma-irradiation in many wild-type p53 human melanoma lines. **Cancer Res** 1996; 56:840-7.

Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Altered expression of cell cycle regulators Cyclin D1, p14, p16, Cdk4 and Rb in nodular melanomas. **Int J Oncol** 2004; 25:1559-65.

Balch CM, Soong S-J, Gershenwald JE, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. **J Clin Oncol** 2001a; 19:3622-34.

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

Bales ES, Dietrich C, Bandyopadhyay D, et al. High levels of expression of p27KIP1 and cyclin E in invasive primary malignant melanomas. **J Invest Dermatol** 1999; 113:1039-46.

Barnhill RL, Katzen J, Spatz A, Fine J, Berwick M. The importance of mitotic rate as a prognostic factor for localized cutaneous melanoma. **J Cutan Pathol** 2005; 32:268-73.

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

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

Beattie PE, Finlan LE, Kernohan NM, Thomson G, Hupp TR, Ibbotson SH. The effect of ultraviolet (UV) A1, UVB and solar-simulated radiation on p53 activation and p21. **Br J Dermatol** 2005; 152:1001-8.

Bennett DC. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. **Oncogene** 2003; 22:3063-9.

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

Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput *in situ* studies. **J Pathol** 2001; 195:72-9.

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

Busam KJ. The prognostic importance of tumor mitotic rate for patients with primary cutaneous melanoma. **Ann Surg Oncol** 2004; 11:360-1. Epub 2004 Mar 15.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. **J Natl Cancer Inst** 1989; 81:1893-904.

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

Dai DL, Makretsov N, Campos EI, et al. Increased expression of integrin-linked kinase is correlated with melanoma progression and poor patient survival. **Clin Cancer Res** 2003; 9:4409-14.

Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. **Science** 1996; 274:1664-72.

Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser capture microdissection. **Science** 1996; 24:998-1001.

Filmus J, Robles AI, Shi W, Wong MJ, Colombo LL, Conti CJ. Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. **Oncogene** 1994; 9:3627-33.

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

Flores JF, Walker GJ, Glendening JM, et al. Loss of p16^{INK4a} and p15^{INK4b} genes as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma. **Cancer Res** 1996; 56:5023-32.

Francken AB, Shaw HM, Thompson JF, et al. The prognostic importance of tumor mitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous melanoma and long follow-up. **Ann Surg Oncol** 2004; 11:426-33.

Frantz GD, Pham TQ, Peale FV Jr, Hillan KJ. Detection of novel gene expression in paraffin-embedded tissues by isotopic in situ hybridization in tissue microarrays. **J Pathol** 2001; 195:87-96.

Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: cyclin D1: normal and abnormal functions. **Endocrinology** 2004; 145:5439-47. Epub 2004 Aug 26.

Gerbaud L, Lejeune ML, Abou-Samra T, et al. Sentinel network of pathologists; sentinel network of dermatologists for melanoma:

epidemiological survey of melanoma in the Auvergne region (France): is there an increased incidence in Auvergne? **Eur J Epidemiol** 2003; 18:331-5.

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

Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). **Oncogene** 1995; 11:211-9.

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

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

Hayward NK. Genetics of melanoma predisposition. **Oncogene** 2003; 22:3053-62.

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

Holland EA, Beaton SC, Becker TM, et al. Analysis of the p16 gene CDKN2, in 17 Australian melanoma kindreds. **Oncogene** 1995; 11:2289-94.

Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005. **CA Cancer J Clin** 2005; 55:10-30.

Karjalainen JM, Eskelinen MJ, Kellokoski JK, et al. p21^{WAF1/CIP1} expression in stage I cutaneous malignant melanoma: its relationship with p53, cell proliferation and survival. **Br J Cancer** 1999; 79:895-902.

Katalinic A, Kunze U, Schafer T. Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). **Br J Dermatol** 2003; 149:1200-6.

Kashani-Sabet M, Shaikh L, Miller JR 3rd, et al. NF-kappa B in the vascular progression of melanoma. **J Clin Oncol** 2004; 22:617-23.

Kielhorn E, Provost E, Olsen D, et al. Tissue microarray-based analysis shows phospho-catenin expression in malignant melanoma is associated with poor outcome. **Int J Cancer** 2003; 103:652-6.

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

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

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4:844-7.

Korabiowska M, Ruschenburg I, Betke H, et al. Downregulation of the retinoblastoma gene expression in the progression of malignant melanoma. **Pathobiology** 2001; 69:274-80.

Korabiowska M, Bauer H, Quentin T, Stachura J, Cordon-Cardo C, Brinck U. Application of new in situ hybridization probes for Ku70 and Ku80 in tissue microarrays of paraffin-embedded malignant melanomas: correlation with immunohistochemical analysis. **Hum Pathol** 2004; 35:210-6.

Lewis F, Maughan NJ, Smith V, Hillan K, Quirke P. Unlocking the archive--gene expression in paraffin-embedded tissue. **J Pathol** 2001; 195:66-71.

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

Maelandsmo GM, Florenes VA, Hovig E, et al. Involvement of the pRb/p16/Cdk4/cyclin D1 pathway in the tumorigenesis of sporadic malignant melanomas. **Br J Cancer** 1996a; 73:909-16.

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

Mangini J, Li N, Bhawan J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions. **Am J Dermatopathol** 2002; 117:270-81.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas/2005: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2004.

Nagore E, Oliver V, Botella-Estrada R, Moreno-Picot S, Insa A, Fortea JM. Prognostic factors in localized invasive cutaneous melanoma: high value of mitotic rate, vascular invasion and microscopic satellitosis. **Melanoma Res** 2005; 15:169-77.

Ohta M, Nagai H, Shimizu M, et al. Rarity of somatic and germline mutations of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor gene, Cdk4I, in melanoma. **Cancer Res** 1994; 54:5269-72.

Ohta M, Berd D, Shimizu M, et al. Deletion mapping of chromosome region 9p21-p22 surrounding the CDKN2 locus in melanoma. **Int J Cancer** 1996; 65:762-7.

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

Pacifico MD, Grover R, Richman PI, Daley FM, Buffa F, Wilson GD. Development of a tissue array for primary melanoma with long-term follow-up: discovering melanoma cell adhesion molecule as an important prognostic marker. **Plast Reconstr Surg** 2005; 115:367-75.

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

Pavey SJ, Cummings MC, Whiteman DC, et al. Loss of p16 expression is associated with histological features of melanoma invasion. **Melanoma Res** 2002; 12:539-47.

Piepkorn M. Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A (p16)/ARF tumor suppressors. **J Am Acad Dermatol** 2000; 42:705-22; quiz 723-6.

Queensland Cancer Registry Health Information Centre Queensland Health Level. **Cancer in Queensland incidence and mortality 1982 to 1998**. Available from: <URL:<http://www.health.qld.gov.au/hic/1998cancer.pdf>> [2005 May 12].

Rane S, Cosenza SC, Mettus RV, Reddy EP. Germ line transmission of *Cdk4*^{R24C} mutation facilitates tumorigenesis and escape from cellular senescence. **Mol Cell Biol** 2002; 22:644-56.

Reed JA, Loganzo F Jr, Shea CR, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions

correlates with invasive stage of tumor progression. **Cancer Res** 1995; 55:2713-8.

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

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

Rubin MA. Use of laser capture microdissection, cDNA microarrays, and tissue microarrays in advancing our understanding of prostate cancer. **J Pathol** 2001; 195:80-6.

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

Shen SS, Zhang PS, Eton O, Prieto VG. Analysis of protein tyrosine kinase expression in melanocytic lesions by tissue array. **J Cutan Pathol** 2003; 30:539-47.

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

Slominski A, Wortsman J, Nickoloff B, McClatchey K, Mihm MC, Ross JS. Molecular pathology of malignant melanoma. **Am J Clin Pathol** 1998; 110:788-94.

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

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

Sparrow LE, Eldon MJ, English DR, Heenan PJ. p16 and p21WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. **Am J Dermatopathol** 1998; 20:255-61.

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

Sulaimon SS, Kitchell BE. The basic biology of malignant melanoma: molecular mechanisms of disease progression and comparative aspects. **J Vet Intern Med** 2003; 17:760-72.

Sviderskaya EV, Gray-Schopfer VC, Hill SP, et al. p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2A deficiency in human melanocyte senescence, apoptosis, and immortalization: possible implications for melanoma progression. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:723-32.

Tanaka N, Odajima T, Mimura M, et al. Expression of Rb, pRb2/p130, p53, and p16 proteins in malignant melanoma of oral mucosa. **Oral Oncol** 2001; 37:308-14.

Trau H, Kopf AW, Rigel DS, et al. Regression in malignant melanoma. **J Am Acad Dermatol** 1983; 8:363-8.

Trotter MJ, Tang L, Tron VA. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) in human cutaneous malignant melanoma. **J Cutan Pathol** 1997; 24:265-71.

de Vries E, Schouten LJ, Visser O, et al. Rising trends in the incidence of and mortality from cutaneous melanoma in the Netherlands: a Northwest to Southeast gradient? **Eur J Cancer** 2003; 39:1439-46.

Wu Z, Wu L, Li L, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis induced by shikonin via a caspase-9-dependent mechanism in human malignant melanoma A375-S2 cells. **J Pharmacol Sci** 2004; 94:166-76.

Zhang H, Rosdahl I. Deletion in p16INK4a and loss of p16 expression in human skin primary and metastatic melanoma cells. **Int J Oncol** 2004; 24:331-5.

Zhang H, Rosdahl I. Expression profiles of Id1 and p16 proteins in all-trans-retinoic acid-induced apoptosis and cell cycle re-distribution in melanoma. **Cancer Lett** 2005; 217:33-41.