

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE
SINALIZAÇÃO MAPK EM MELANOMAS PRIMÁRIOS
EM PACIENTES SUBMETIDOS A LINFONODOS
SENTINELA**

ALINE SAYURI FURUYA SHIGA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Shiga, Aline Sayuri Furuya

Estudo da expressão de proteínas da via de sinalização MAPK em melanomas primários em pacientes submetidos a linfonodos sentinela / Aline Sayuri Furuya Shiga – São Paulo, 2012.

71p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. MELANOMA. 2. CÂNCER DA PELE. 3. BIÓPSIA DE LINFONODO SENTINELA. 4. METÁSTASES. 5. SISTEMA DE SINALIZAÇÃO DAS MAP KINASES.

Dedicatórias.

Este estudo é dedicado à doentes acometidos pela patologia estudada a fim de aprimorar o tratamento do melanoma

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Rafael Malagoli Rocha, do Departamento de Patologia do Hospital A. C. Camargo, pela oportunidade de realizar este projeto.

Ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo, na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Fernando Antonio Soares, e também à equipe técnica responsável pela realização de *tissue microarray* e imuno-histoquímica.

Ao Dr. João Duprat Neto, do Hospital A. C. Camargo, pois, sem o seu apoio e a sua contribuição, este estudo não teria sido possível.

Ao Dr. Gilles Landman, da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, e a Silvana Santos, pelas contribuições ao texto e em estatística.

RESUMO

Shiga ASF. **Estudo da expressão de proteínas da via de sinalização MAPK em melanomas primários de pacientes com e sem micrometástases em linfonodos sentinela.** São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Os melanomas correspondem a 3% de todos os tumores que podem ocorrer na pele e são responsáveis por 4% de todas as mortes por câncer. Devido à alta possibilidade de metástase, é o tumor de pele de maior gravidade e de pior prognóstico. Neste estudo, foi avaliada a expressão das proteínas da via de sinalização MAPK em amostras de melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm, com ou sem micrometástases em linfonodo sentinela, recuperadas em prontuários de 63 pacientes tratados no período de 1997 a 2007 cujas informações atendiam aos critérios de inclusão para esta investigação. Após revisão das lâminas e blocos para confirmação diagnóstica e para estabelecimento dos parâmetros prognósticos, as áreas representativas dos tumores foram selecionadas em lâminas coradas por HE, e os blocos com tecido tumoral foram utilizados para a construção de *tissue microarrays* (TMAs). Dois fragmentos de cada amostra foram depositados de forma coordenada no bloco receptor e a leitura das lâminas foi realizada por um mesmo patologista em microscópio ótico comum. Os resultados foram classificados em positivos ou negativos, de acordo com a intensidade da reação. Esses achados foram correlacionados com a sobrevida câncer-específica e livre da doença em cinco anos. Os aspectos epidemiológicos, clínicos e histológicos desses melanomas cutâneos são apresentados descritivamente. Foi observada expressão infrequente de RAS (8% em membrana e 15% em citoplasma). Expressão de RAF nuclear, de MEK e de ERK foi positiva, respectivamente, em 65%, 95% e 67% das amostras. Não houve associação significativa entre a expressão dessas proteínas e a sobrevida câncer-específica e livre da doença dos pacientes em cinco anos.

SUMMARY

Shiga ASF. **[Expression of MAPK pathway proteins in primary melanomas with or without sentinel lymph nodes micro metastasis]**. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Melanomas represent 3% of all skin tumors and 4% of all death by cancer. Due to its high possibility of metastasis, melanoma is the most severe skin tumor, which presents the worst prognosis. In this study, MAPK pathway proteins were assessed in samples of ≥ 1 mm primary melanomas with or without sentinel lymph nodes micro metastasis collected from the files of 63 patients treated along 1997 to 2007 whose information was in accordance with the inclusion criteria adopted for this investigation. After revision of slides and blocks for confirming diagnosis and establishing prognostic parameters, representative tumor areas were carefully selected in slides stained by HE, and tissue microarrays (TMAs) were constructed using the blocks with tumor tissue. Two fragments of each sample from different tumor areas were deposited in the receptor block, and slides were read in optical microscopy by the same pathologist. Positive or negative results were classified according to the intensity of the reaction. Such findings were correlated with cancer-specific and disease-free survival in five years. Epidemiologic, clinical, and histological findings are described. Infrequent RAS expression was observed in membrane (8%) and cytoplasm (15%). Nuclear RAF, MEK and ERK expression was positive in 65%, 95% and 67% of the specimens. There were no significant associations between the expression of the studied MAPK proteins and cancer-specific or disease-free survival in five years.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via MAPK-quinase.....	20
Figura 2	Imagens fotográficas da lâmina de TMA com expressão positiva (à esquerda) e negativa (à direita) de RAS.....	47
Figura 3	Imagens fotográficas da lâmina de TMA com expressão positiva (à esquerda) e negativa (à direita) de RAF.....	48
Figura 4	Imagens fotográficas da lâmina de TMA com expressão positiva (à esquerda) e negativa (à direita) de MEK.....	49
Figura 5	Imagens fotográficas da lâmina de TMA com expressão positiva (à esquerda) e negativa (à direita) de ERK.....	49
Figura 6	Representação gráfica da distribuição das amostras não avaliadas, positivas e negativas para as proteínas da via MAPK (RAS/RAF/ MEK/ERK).....	50
Figura 7	Curvas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme o gênero do pacientes.....	53
Figura 8	Curvas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme expressão positiva ou negativa de RAS citoplasmática.....	54
Figura 9	Curvas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme expressão positiva ou negativa de RAF nuclear.....	54

Figura 10	Curvas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme expressão positiva ou negativa de ERK citoplasmática.....	55
------------------	--	----

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Informações coletadas de prontuários médicos de 63 pacientes com melanoma primário com espessura ≥ 1 mm para preenchimento de ficha de caracterização individual.....	33
Tabela 1	Distribuição das frequências relativas aos achados clínico-demográficos em amostra de 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1 mm.....	40
Tabela 2	Distribuição das frequências relativas à localização dos tumores primários em amostra de 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1 mm.....	41
Tabela 3	Distribuição das frequências relativas aos achados cirúrgicos em amostra de 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1 mm.....	42
Tabela 4	Distribuição das frequências relativas aos achados anátomo-patológicos em amostra de 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1 mm.....	44
Tabela 5	Distribuição das frequências relativas à localização das recidivas em 23 dentre 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1 mm.....	46
Tabela 6	Distribuição das frequências absolutas relativas aos escores finais observados no estudo imuno-histoquímico das proteínas RAS (membrana e citoplasma), RAF (núcleo), MEK (citoplasma) e ERK (citoplasma).....	46

Tabela 7 Risco relativo (RR) de sobrevida câncer-específica em casos de melanoma primário com espessura igual ou maior que 1 mm em relação à expressão das proteínas RAS citoplasmática, RAF nuclear e ERK citoplasmática... 52

Tabela 8 Risco relativo (RR) de sobrevida livre da doença em casos de melanoma primário com espessura igual ou maior que 1 mm em relação à expressão das proteínas RAS citoplasmática, RAF nuclear e ERK citoplasmática... 52

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
2.1	Objetivo geral	4
2.2	Objetivos específicos	4
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1	Epidemiologia	5
3.2	Fatores de risco	6
3.3	Desenvolvimento do melanoma	7
3.4	Características clínicas.....	8
3.5	Características histopatológicas	9
3.6	Diagnóstico e tratamento.....	12
3.7	Metástases linfonodais	12
3.8	Metástases cutâneas.....	13
3.9	Metástases à distância	13
3.10	Terapias adjuvantes	14
3.11	Acompanhamento dos pacientes	15
3.12	Prognóstico.....	16
3.13	Aspectos moleculares	17
3.13.1	A via MAPK	18
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1	Casuística.....	31
4.2	Materiais e métodos	32
4.2.1	Protocolo de estudo.....	32
4.2.2	Coleta de lâminas e blocos.....	34
4.2.3	Confecção do TMA.....	34

4.2.4	Imuno-histoquímica (IHQ).....	35
4.3	Análise estatística.....	39
5	RESULTADOS.....	40
5.1	Achados clínico-demográficos.....	40
5.2	Localização dos tumores.....	41
5.3	Achados cirúrgicos.....	41
5.4	Achados anátomo-patológicos.....	42
5.5	Achados de disseminação tumoral.....	45
5.6	Achados relativos à evolução dos pacientes.....	45
5.7	Achados imuno-histoquímicos.....	46
5.8	Influência dos achados imuno-histoquímicos na sobrevida dos pacientes.....	50
6	DISCUSSÃO.....	56
7	CONCLUSÕES.....	66
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa
- Anexo 2** Dados clínico-demográficos de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm.
- Anexo 3** Dados histológicos de tecido tumoral de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm (parte 1).
- Anexo 4** Dados histológicos de tecido tumoral de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm (parte 2).
- Anexo 5** Dados de disseminação tumoral de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm.
- Anexo 6** Dados da evolução de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm.
- Anexo 7** Dados do estudo da expressão da via MAPK em melanomas com espessura igual ou maior que 1 mm.

1 INTRODUÇÃO

Da transformação maligna e da proliferação dos melanócitos derivados do tecido neuroectodérmico presentes na camada basal da epiderme resulta o melanoma, tumor que se desenvolve do estágio radial para a fase de crescimento vertical e para a doença metastática (ALONSO et al. 2004).

Os melanomas correspondem a 3% de todos os tumores que podem ocorrer na pele e são responsáveis por 4% de todas as mortes por câncer. Devido à alta possibilidade de metástase, é o tumor de pele de maior gravidade e de pior prognóstico (RIKER et al. 2010)

A epidemiologia e os fatores prognósticos de ordem clínica e histológica são bem definidos e relativamente consensuais com relação aos melanomas (ALONSO et al. 2004). Não obstante, trata-se de doença com comportamento clínico muito peculiar a cada paciente, e nem sempre esses fatores são suficientes para predizer prognóstico acurado e específico de cada caso (COSTACHE et al. 2007), razão pela qual ainda são importantes estudos que tragam novas informações ou que ratifiquem dados já conhecidos sobre a epidemiologia e o perfil clínico e histológico de pacientes com melanoma primário, apresentem ou não micrometástases em linfonodo sentinela.

A espessura do tumor é fator prognóstico importante na determinação do risco de metástases. Melanomas cutâneos com espessura de até 1,0 mm

estão associados com alta taxa de sobrevida em cinco anos depois de excisão local ampla. Por outro lado há um subconjunto de pacientes com melanomas finos ($\leq 1,0$ mm) que desenvolvem metástases, o que torna ainda mais relevantes estudos sobre a doença (BALCH et al. 2009).

O comprometimento linfonodal, que é outro fator prognóstico da maior importância, geralmente ocorre em lesões mais espessas, acometendo 20% dos pacientes cujos tumores apresentam espessura de 1 mm a 4 mm. O linfonodo sentinela é primeiro linfonodo a receber drenagem na cadeia linfática, e, por isso, a pesquisa desse linfonodo é indicada rotineiramente mesmo em casos de melanomas menores associados com outras características clínicas e histológicas, pois permite avaliar o estado de toda a cadeia linfática (LAGES et al. 2011).

Paralelamente aos estudos clínicos e histológicos, muitas investigações em biologia molecular vêm colaborando para o entendimento mais amplo dos melanomas, no sentido de elucidar aspectos de diagnóstico, classificação, prognóstico e tratamento da doença. Nesse sentido, têm sido vistos avanços significativos no entendimento das vias que levam a célula a desenvolver melanoma, por estarem envolvidas na alteração do melanócito, por promoverem proliferação celular ou por interferirem na apoptose (IBRAHIM e HALUSKA 2009; DHOMEN e MARAIS 2009; PALMIERI et al. 2009; RUSSO et al. 2009; SMALLEY 2010).

A via MAPK, que envolve a via RAS/RAF/MEK/ERK, é a que vem recebendo maior atenção dos estudiosos do melanoma cutâneo, pois se apresenta hiperativada na maioria desses tumores, com importante atuação

na regulação da proliferação, invasão e sobrevivência das células tumorais nessa doença (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; FECHER et al. 2008; DHOMEM e MARAIS 2009; SMALLEY 2010; INAMDAR et al. 2010). Por se tratar de via que participa na indução, na manutenção e na progressão do melanoma, tem sido importante alvo terapêutico da doença (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; DHOMEN e MARAIS 2009; PALMIERI et al. 2009; INAMDAR et al. 2010).

Com o propósito de contribuir com os conhecimentos epidemiológicos, clínicos e histológicos bem como com o entendimento da via MAPK em melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm, com ou sem micrometástases em linfonodo sentinela, realizamos esta investigação, que enfatizou a pesquisa de RAS/RAF/MEK/ERK e a correlação da expressão dessas proteínas com a sobrevida dos pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a expressão imuno-histoquímica das proteínas da via MAK em microarranjos de tecido (TMA) de melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm de pacientes com ou sem micrometástases em linfonodo sentinela.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrever os aspectos epidemiológicos, clínicos e histológicos de melanomas cutâneos primários em pacientes com e sem micrometástases em linfonodo sentinela.

Avaliar a associação entre a expressão das proteínas da via MAPK e a sobrevida câncer-específica e livre da doença dos pacientes em cinco anos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 EPIDEMIOLOGIA

A incidência de melanoma tem aumentado drasticamente nos últimos 50 anos (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; AMERSI e MORTON 2007; FECHER et al. 2008; RUSSO et al. 2009; CHO e CHIANG 2010; BANDARCHI et al. 2010; GARBE et al. 2010).

Embora represente apenas 4% a 5% das neoplasias malignas da pele, que, por sua vez, respondem por 25% dos casos de câncer no Brasil (INCA, 2012), é a mais grave devido à forte possibilidade de metástases e à alta mortalidade, que chega a atingir 60% (BANDARCHI et al. 2010).

De acordo com o portal do Instituto Nacional de Câncer (INCA), estimam-se, para 2012, 6.230 novos casos de melanoma, sendo 3.170 homens e 3.060 mulheres. A previsão do mesmo INCA para 2012 é que haja, neste ano, 1.392 mortes (827 homens e 565 mulheres) decorrentes de melanoma (Ministério da Saúde 2012).

O Instituto Nacional de Saúde Americano relatou 62.480 novos casos de melanoma no ano de 2008, e 8.420 desses pacientes morreram em decorrência da doença (CHO e CHIANG 2010; SMALLEY 2010). Até o ano de 2015, o risco estimado para a população geral de desenvolvimento de melanoma durante a vida será de 1:50,1 (GERSHENWALD e ROSS 2011). Nos Estados Unidos da América, o melanoma representa o sexto e sétimo tipos

de câncer mais comum em homens e mulheres, respectivamente (CHO e CHIANG 2010).

A incidência de melanoma é igual em homens e em mulheres, e incomum em crianças. Em geral, acomete os membros inferior e/ou superior mais frequentemente em mulheres; o dorso é mais acometido em homens adultos caucasianos na quarta década de vida (BANDARCHI et al. 2010).

3.2 FATORES DE RISCO

Os fatores de risco consistem em fatores ambientais, em que se destaca a radiação ultravioleta (PLATZ et al. 2008; CHO E CHIANG 2010), e em fatores individuais, como as características fenotípicas (cor do cabelo, tipo de pele, presença de sardas, sensibilidade solar), a história familiar, o número de nevos, a presença de nevos atípicos e nevos congênitos (RUSSO et al. 2009; CHO e CHIANG 2010; BANDARCHI et al. 2010). O risco de melanoma aumenta em duas a quatro vezes na presença de um ou dois fatores de risco, e pode aumentar 11 vezes na presença de mais de três fatores (CHO e CHIANG 2010).

Fatores de risco importantes também incluem a presença de mais que 50 nevos, mais que cinco nevos displásicos, grande nevo congênito, nevo maior que 6 mm, e pacientes submetidos à PUVA-terapia, a bronzeamento artificial, à imunossupressão, com tendência à queimadura solar, além de cicatrizes, xeroderma pigmentoso e fatores genéticos. O fator de risco mais importante é a exposição intermitente ao sol, e mais que 65% dos

melanomas estão relacionados com exposição solar (BANDARCHI et al. 2010).

Indivíduos com história familiar significativa de melanoma têm risco aumentado em 30 a 70 vezes de desenvolver melanoma (IBRAHIM e HALUSKA 2009).

3.3 DESENVOLVIMENTO DO MELANOMA

A melanina é produzida pelos melanócitos em organelas específicas chamadas melanossomos, que são variações de lisossomos em que a enzima tirosinase age sobre a tirosina, resultando em formação de dopa e dopaquinona. Os pigmentos de melanina sintetizados nos melanócitos são transferidos para os queratinócitos (BANDARCHI et al. 2010)

De acordo com o aclamado modelo Clark de gênese tumoral (CLARK et al. 1989), o momento em que a célula neoplásica gera uma descendente capaz de passar por fase de crescimento vertical (VGP) seria o momento em que ocorreria a evolução clonal – uma célula de melanoma cujos descendentes podem adentrar nas camadas mais profundas da derme, em vez de promover proliferação tumoral na epiderme adjacente. É por isso que melanomas com propriedades VGP são capazes de metastatizar (CROTTY e MENZIES 2004).

O melanoma cutâneo provém de melanócitos, que são células produtoras de pigmento, derivadas da crista neural, e que são encontradas na junção derme-epiderme da pele. O padrão de crescimento e

disseminação do melanoma tem sido descrito em duas fases: a primeira, de padrão horizontal ou radial, em que o melanoma está primariamente confinado à epiderme (embora possa penetrar a derme papilar), seguida da fase de crescimento vertical, em que o melanoma adquire a capacidade de invadir camadas mais profundas da derme. Metástases tendem a ocorrer, primeiramente, em linfonodos regionais e, subsequentemente, para vários sítios, representando, respectivamente, os estádios III e IV estabelecidos pelo *American Joint Committee on Cancer-AJCC* (GERSHENWALD e ROSS 2011).

3.4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A suspeita de melanoma se refere a lesões com características clínicas que incluem assimetria, irregularidade das bordas, variedade na coloração, tamanho igual ou maior que 5 mm, crescimento nodular e redução de tamanho (BANDARCHI et al. 2010; GARBE et al. 2010). O diagnóstico clínico tem sensibilidade de 70% (GARBE et al. 2010).

A propedêutica armada, que inclui a dermatoscopia, aumenta a sensibilidade do diagnóstico para 89%, e apresenta especificidade de 79% (GARBE et al. 2010).

Em pacientes com risco aumentado para o desenvolvimento da doença, principalmente aqueles com a Síndrome de Nevo Atípico, a detecção de mudanças nas lesões ou o aparecimento de novas lesões ao exame clínico, a dermatoscopia associada com fotografia de corpo inteiro

também e de grande valia (GARBE et al. 2010).

3.5 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

A classificação da Organização Mundial da Saúde-OMS para tumores de pele permite a divisão do melanoma em subtipos baseados em características clínicas e histológicas, que se correlacionam com o curso natural da doença e, também, com dados de genoma. São reconhecidos três grandes subtipos de melanoma maligno invasivo com componente de disseminação intraepidermal adjacente: (1) o Melanoma Superficial – SSM; (2) Melanoma Lentigo Maligno – LMM; e (3) o Melanoma Maligno Nodular – NMM (DUNCAN 2009).

Há quatro subtipos histológicos principais de melanoma: o melanoma de disseminação superficial, o nodular, o lentiginoso acral e o lentigo maligno (IBRAHIM e HALUSKA 2009; PALMIERI et al. 2009; ROTHER e JONES 2009; GARBE et al. 2010).

CLARK et al. (1969) classificaram os melanomas em tipo extensivo superficial, lentigo maligno e nodular. Mais tarde, REED (1976) acrescentou um quarto tipo chamado melanoma maligno acrolentiginoso. A atual classificação e suas respectivas incidências relativas são as seguintes: Melanoma Extensivo Superficial (50% - 75%), Melanoma Nodular (15% - 35%), Lentigo Maligno (5% - 15%), Melanoma Acral Lentiginoso (5% - 10%) e Melanoma desmoplásico (pouco frequente) (BANDARCHI et al. 2010; SÁNCHEZ YUS et al. 2010).

O SSM é o mais comum (70% dos casos), e ocorre em qualquer sítio, sem predileção por local, principalmente em peles expostas ao sol intermitentemente; é caracterizado por crescimento radial lateral (IBRAHIM e HALUSKA 2009; PALMIERI et al. 2009; GARBE et al. 2010). À histologia, é caracterizado pela presença de componente intraepidérmico que apresenta característica pagetoide e crescimento “em ninho” em todos os níveis da epiderme (DUNCAN 2009)

Os melanomas nodulares representam 15% do total de melanomas, e 5% correspondem ao melanoma acral, que é o tipo de melanoma que mais incide em afro-descendentes e orientais, e está associado com pior prognóstico (IBRAHIM e HALUSKA 2009).

O melanoma nodular é caracterizado por predomínio de tumor invasivo na derme (DUNCAN 2009). Trata-se de lesão primariamente nodular, exofítica, negro-amarronzada, frequentemente com áreas de erosão ou sangrante, e caracterizada por uma fase vertical e agressiva, com fase horizontal curta ou ausente (GARBE et al. 2010). Por definição, não apresenta fase de crescimento radial, e pode ser nodular, polipoide ou pedunculado (BANDARCHI et al. 2010).

Um componente intraepidérmico pode estar presente no melanoma invasivo. Ocasionalmente, o componente epidérmico pode ser mínimo, sugerindo a possibilidade de o tumor estar representando metástase dermal. O tumor é composto de pequenas ilhas que agregam células tumorais que, em conjunto, formam o nódulo tumoral (DUNCAN 2009).

Histologicamente, o componente intradérmico do melanoma lentigo

maligno é caracterizado predominantemente por proliferação de células individuais localizadas nas camadas basais da epiderme (DUNCAN 2009; BANDARCHI et al. 2010). Ocorre na pele superexposta ao sol, e na face e extremidades superiores de pacientes idosos (GARBE et al. 2010; BANDARCHI et al. 2010). Basicamente, é um melanoma *in situ*, caracterizado por atrofia epidérmica e extensiva proliferação lentiginosa de células de melanoma com formações de ninhos que se estendem para os anexos cutâneos.

Vários métodos de tratamento podem ser usados para o tratamento de lentigo maligno, incluindo crioterapia, radiação superficial e excisão cirúrgica com mapeamento e cirurgia modificada de Mohs (BANDARCHI et al. 2010).

O melanoma acral lentiginoso é comum na região palmar, plantar e ungueal de populações negras e orientais (BANDARCHI et al. 2010). É tipicamente palmo-plantar ou subungueal. Em sua fase intraepidérmica, há pigmentação irregular e pobremente circunscrita, seguida de pigmentação pobremente circunscrita e, em seguida, uma área nodular que reflete o padrão invasivo de crescimento (GARBE et al. 2010).

A classificação do melanoma em subtipos permite a identificação tanto clínica quanto histológica de formas distintas de melanoma. No entanto, essa classificação não permite separá-los em grupos que os diferenciem de acordo com o curso natural da doença e prognóstico (DUNCAN 2009).

Em alguns casos, quando o diagnóstico histológico não é claro, a

avaliação das proteínas S-100, HMB45 e Melan-A pode ser útil para a confirmação da presença de células melanocíticas em lesões tumorais (GARBE et al. 2010).

3.6 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico de melanoma é sempre concluído por biópsia (BANDARCHI et al. 2010).

Das neoplasias cutâneas, o melanoma é a que apresenta o maior índice de mortalidade, e a excisão cirúrgica é o único tratamento efetivo (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; AMERSI e MORTON 2007; IBRAHIM e HALUSKA 2009; RUSSO et al. 2009; GARBE et al. 2010).

3.7 METÁSTASES LINFONODAIS

Os melanomas podem metastatizar por via hematogênica ou por via linfática. Cerca de dois terços dessas metástases são confinados ao linfonodo regional, e podem se manifestar como (GARBE et al. 2010):

- Micrometástases, que não são diagnosticadas clinicamente ou por exames de imagem, mas apenas por análises imuno-histoquímicas ou por técnicas de PCR.
- Metástases satélites, em que os nódulos intralinfáticos são observados em distância maior que 2 cm do tumor primário.
- Metástases em trânsito, localizadas em distância de 2 cm entre o

tumor primário e o primeiro linfonodo.

- Metástases linfonodais diagnosticadas clinicamente.

Os parâmetros importantes para a avaliação da metástase linfonodal incluem a profundidade da invasão a partir da cápsula, o diâmetro máximo e a localização do linfonodo (MOROI 2009).

As taxas de sobrevida de 10 anos são de 30%-70% em pacientes com micrometástases; 30%-50% em pacientes com metástases satélites; e 20%-40% em pacientes com metástases linfonodais diagnosticadas clinicamente (GARBE et al. 2010).

3.8 METÁSTASES CUTÂNEAS

O tratamento cirúrgico é a terapêutica de escolha para metástases cutâneas, embora terapias sistêmicas também devam ser consideradas quando o número de lesões ou a extensão das lesões não as tornam passíveis de cirurgia. Para lesões múltiplas em um mesmo membro, a perfusão desse segmento com melfalano, com ou sem fator de necrose tumoral (TNF), pode ser realizada (GARBE et al. 2010).

3.9 METÁSTASES À DISTÂNCIA

Os principais órgãos acometidos por metástases de melanoma são o fígado, os pulmões e o cérebro (AMERSI e MORTON 2007; IBRAHIM e HALUSKA 2009; GARBE et al. 2010), e a investigação desses órgãos deve

fazer parte da rotina de diagnóstico e acompanhamento de casos de melanoma (GARBE et al. 2011).

3.10 TERAPIAS ADJUVANTES

Terapias adjuvantes como quimioterapia e imunoterapia são indicadas para o tratamento de pacientes com lesões com espessura menor que 1,5 mm sem metástases, mas classificadas em estágios II e III por apresentarem alto risco de disseminação tumoral. Também são realizadas em pacientes com tumores recorrentes inoperáveis, com metástase regional ou à distância, classificados em estágio IV (GARBE et al. 2010).

A terapia de radiação do tumor primário é raramente indicada, mas pode ser realizada em tumores primários inoperáveis. Não há indicação de radioterapia em linfonodos após a excisão do melanoma primário (GARBE et al. 2011).

A quimioterapia sistêmica e quimioimunoterapia são especialmente indicadas para tumores não ressecáveis, metástases locorregionais não ressecáveis e metástases à distância (tumores em estágio IV). Como o tratamento nessas situações é eminentemente paliativo, a instituição desse tipo de terapêutica deve levar em consideração o seu efeito sobre a qualidade de vida do paciente (GARBE et al. 2010).

Respostas completas à terapia adjuvante são raramente atingidas quando a doença está no estágio IV, com metástases à distância. Nesses casos, a indicação de terapia adjuvante deve ter dois objetivos principais: o

prolongamento da expectativa de vida do paciente, e a redução do tamanho do tumor ou de sítios tumorais que resulte em alívio ou desaparecimento dos sintomas causados pela doença (GARBE et al. 2010).

3.11 ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES

A frequência e o período em que o paciente será acompanhado após o tratamento dependerá das características primárias do tumor. Os primeiros cinco anos após a excisão cirúrgica do tumor primário são os mais críticos, já que 90% de todas as metástases ocorrem durante esse período. Depois disso, a importância de exames clínicos periódicos se deve tanto ao fato de poder ocorrer metástases tardias no melanoma, quanto ao risco aumentado para um segundo melanoma primários em pacientes com história pregressa da doença (GARBE et al. 2011).

O acompanhamento do paciente após tratamento de melanoma consiste em (GARBE et al. 2010):

- 1 identificar a recorrência de tumor ou progressão da doença em estágio inicial;
- 2 investigar a presença de nevos atípicos, de um segundo foco de melanoma (o que ocorre em aproximadamente 10% dos pacientes) e de outras neoplasias cutâneas;
- 3 oferecer suporte psicossocial ao paciente;
- 4 educar e instruir o paciente a realizar o autoexame da pele;
- 5 documentar o curso da doença;

6 administrar e monitorar a terapia adjuvante, quando apropriado.

3.12 PROGNÓSTICO

Nos estágios iniciais do melanoma (como o estágio IA), o prognóstico é favorável, com taxas de sobrevida de 5 e 10 anos estimadas em 97% e 93%, respectivamente. Por outro lado, o prognóstico para pacientes que apresentam metástases à distância (estágio IV) é reservado, com taxas de sobrevida no quinto ano após o tratamento inicial de 12% (GERSHENWALD e ROSS 2011).

Dentre os fatores de pior prognóstico em melanomas cutâneos sem evidências de metástase, destacam-se a maior espessura da lesão, a presença de ulceração e maior atividade mitótica (AMERSI e MORTON 2007; GARBE et al. 2010). Já nos casos de tumores metastáticos, o prognóstico estará associado com evidência de metástase em trânsito, número de linfonodos acometidos, locais de metástases e presença de desidrogenase láctica elevada (AMERSI e MORTON 2007).

A taxa de sobrevida em 10 anos é de 30% a 70% em pacientes com micrometástases; de 30% a 50% em pacientes com metástases satélites e em trânsito; e de 20% a 40% naqueles que apresentam linfonodo palpável (GARBE et al. 2010).

Pacientes cujos linfonodos regionais são palpáveis (estágios IIIB e IIIC) também têm prognóstico reservado, com pelo menos 50% de risco de desenvolvimento de metástases (GERSHENWALD e ROSS 2011).

Casos de metástases à distância têm pior prognóstico, com sobrevida média de apenas seis a nove meses em pacientes sem tratamento (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; IBRAHIM e HALUSKA 2009; RUSSO et al. 2009; SMALLEY 2010; GARBE et al. 2010). A taxa de sobrevida em um ano para esses pacientes é de aproximadamente 50% (EDLUNDH-ROSE et al. 2006).

3.13 ASPECTOS MOLECULARES

Os avanços ocorridos nas últimas décadas na área da biologia molecular têm trazido conhecimentos cada vez mais amplos sobre diferentes alterações moleculares que se associam a diferentes processos neoplásicos humanos. Ao nosso estudo interessa, especificamente, as mutações na via BRAF, presentes em cerca de 12% das neoplasias malignas, e de modo especial nos melanomas (DAVIES et al. 2002).

O gene BRAF codifica a proteína serina/treonina-quinase que desempenha função sinalizadora nas vias relacionadas com a proliferação e diferenciação celular. Algumas mutações nesse gene aumentam significativamente o seu produto, o que leva a crescimento neoplásico (DAVIES et al. 2002).

Mutações na via BRAF são mais frequentes em melanomas nodulares e em melanomas extensivos superficiais, e são raras em melanomas lentiginosos acrais e em melanomas não cutâneos (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; POYNTER et al. 2006; ROTHER e JONES 2009).

Diversos estudos evidenciam maior frequência de mutações em BRAF em melanomas decorrentes de exposição solar intermitente, especialmente em tronco e extremidades inferiores (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; POYNTER et al. 2006; FECHER et al. 2008; PALMIERI et al. 2009). A frequência dessas mutações é menor em melanomas decorrentes de exposição solar crônica e em melanomas não relacionados à exposição solar, nos quais já foi registrada maior frequência de mutações em NRAS em lesões localizadas em extremidades superiores (POYNTER et al. 2006; FECHER et al. 2008).

Nos melanomas associados com exposição solar intermitente, as mutações em BRAF são geralmente acompanhadas pela perda de PTEN. Mutações em BRAF e em NRAS são infrequentes em melanomas de mucosa e acral (FECHER et al. 2008).

Devido à importância hoje atribuída a BRAF enquanto elemento relacionado à patogênese do melanoma, é importante compreender os principais aspectos da via *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK), na qual se insere a BRAF, conforme segue.

3.13.1 A via MAPK

Na última década têm sido vistos avanços significativos no entendimento das vias que levam a célula a desenvolver melanoma (IBRAHIM e HALUSKA 2009; DHOMEN e MARAIS 2009; PALMIERI et al. 2009; RUSSO et al. 2009; SMALLEY 2010).

Diversas dessas vias parecem estar envolvidas na alteração do

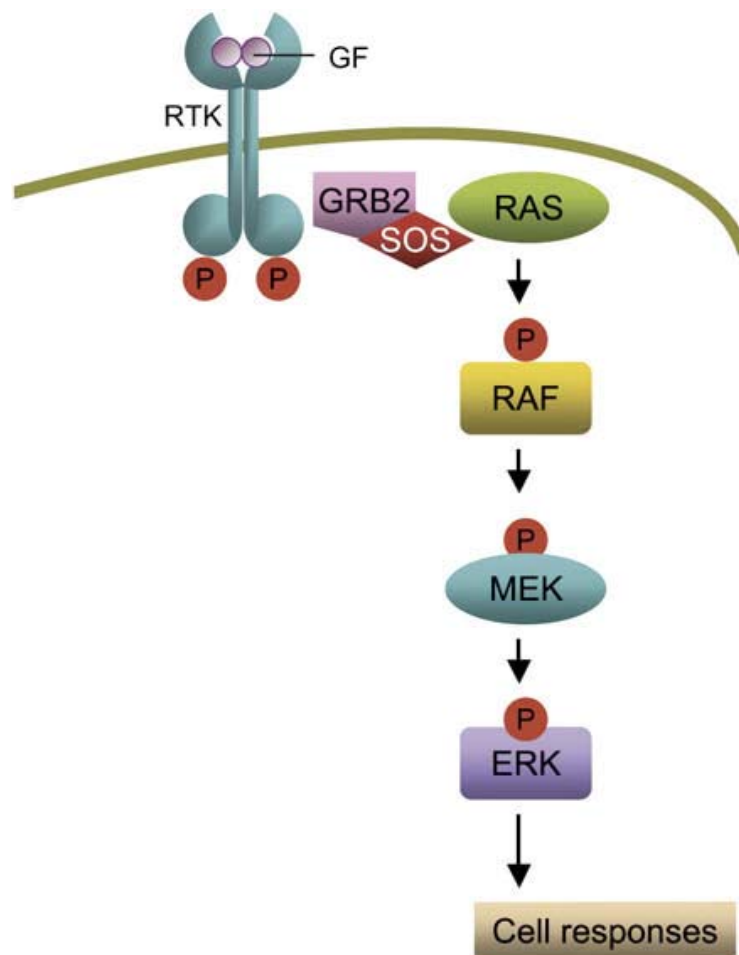
melanócito, por promover proliferação celular ou por interferir na apoptose (IBRAHIM e HALUSKA 2009; PALMIERI et al. 2009). De todas as vias envolvidas no melanoma, maior atenção tem sido dada à via da MAPK (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; FECHER et al. 2008; DHOMEN e MARAIS 2009; SMALLEY 2010; INAMDAR et al. 2010).

Estudos demonstraram que a via RAS/RAF/MEK/ERK é hiperativada na maioria dos melanomas, exercendo importante papel na regulação da proliferação, invasão e sobrevivência das células do melanoma (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; FECHER et al. 2008; FRIDAY e ADJEI 2008; SEKULIC et al. 2008; DHOMEN e MARAIS 2009; RUSSO et al. 2009; PALMIERI et al. 2009; SMALLEY 2010). Essa via, portanto, participa na indução, manutenção e progressão do melanoma e tem sido importante alvo terapêutico dessa doença (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; DHOMEN e MARAIS 2009; PALMIERI et al. 2009; INAMDAR et al. 2010).

A ativação da via MAPK, com subsequente ativação de RAS, é iniciada através de receptores tirosina-quinases (RTKs), dentre os quais se incluem fatores de crescimento epidérmico, fatores de crescimento derivados de plaquetas, cKIT, fatores de crescimento vascular endotelial, fatores de crescimento de fibroblastos e FLT-3 (FECHER et al. 2008).

Quando RAS é ativado, inicia-se a sinalização, através do recrutamento de RAF, para a membrana plasmática que, por sua vez, ativa a enzima MEK, o que é seguido de fosforilação e ativação da enzima ERK. Essa enzima ERK regula a expressão gênica, o metabolismo e a função do citoesqueleto para controlar a proliferação, a diferenciação, o

envelhecimento e a morte da celular (DHOMEN e MARAIS 2009), conforme ilustra a Figura 1.



Fonte: Adaptado de DHOMEN e MARAIS (2009).

Figura 1 – Via MAPK-quinase

Estudos revelam que, em melanomas, mutações em BRAF ocorrem em 44% dos casos; em NRAS, 21%; em KRAS, 2%; e em HRAS, 1%. Nesses tumores não foram encontradas mutações em RAF, CRAF, MEK e ERK (EDLUNDH-ROSE et al. 2006).

Mutações em BRAF (mais comuns em nevo comum), em NRAS (em nevo congênito), e em HRAS (em nevo de Spitz) podem promover a ativação da via MAPK (BLOKX et al. 2010).

Há necessidade de melhor caracterização do papel da MAPK no melanoma, particularmente na fase G1 do ciclo celular. Em células de melanoma, a MAPK aumenta a produção de ciclina D1 e diminui p27. Portanto, é esperado que a inibição farmacológica de BRAF ou de MEK leve à interrupção do ciclo celular na fase G1 (SMALLEY 2010). Realmente, tanto os inibidores de BRAF (SB590885, AZ-628 e PLX-4720) quanto os inibidores de MEK (U0126, CI-1040, PD0325901 e AZD6244) tiveram efeito citostático em células de melanoma com a mutação V600E em BRAF, embora em protocolos clínicos esse efeito não tenha se mostrado melhor do que os tratamentos convencionais para a doença (SMALLEY 2010).

Além de seu papel na proliferação celular, MAPK contribui para uma série de outros processos oncogênicos (FECHER et al. 2008; SMALLEY 2010), que incluem aumento da proliferação (devido à inativação da supressão tumoral), aumento da sobrevivência celular (pela modulação de MITF), proteção contra a apoptose induzida por FAS, invasão e metástase pelo do remodelamento da matriz extracelular e angiogênese (FECHER et al. 2008).

Melanomas são conhecidos por serem excepcionalmente resistentes à apoptose, o que contribui para o seu grande potencial metastático e para resistência à quimioterapia, e parece provável que a atividade constitutiva de MAPK, em parte, regule a resposta apoptótica (CARTLIDGE et al. 2008;

FECHER et al. 2008; SMALLEY 2010). Entretanto, o mecanismo dessa influência sobre a apoptose não está bem esclarecido (CARTLIDGE et al. 2008).

A indução de apoptose relacionada ao fator de necrose tumoral no melanoma ocorre a partir da secreção de SMAC/DIABLO pelas mitocôndrias, e pode ser suprimida por MAPK presente no organismo (SMALLEY 2010). Estudos mais recentes têm mostrado que a mutação V600E em BRAF diminui os níveis pró-apoptóticos de Bcl-2, membro da família BIM, através de mecanismos mediados por MAPK (CARTLIDGE et al. 2008; SMALLEY 2010). A família Bcl-2 é essencial na regulação da apoptose (CARTLIDGE et al. 2008).

A ativação constitutiva de MAPK também pode regular a angiogênese através do controle da expressão do fator indutor de hipóxia (GIULIANI et al. 2004; SMALLEY 2010). A mutação V600E em BRAF promove a vascularização pela estimulação autócrina do fator de crescimento vascular endotelial (RUSSO et al. 2009).

Também há evidências de que a atividade da via BRAF/MAP quinase pode contribuir para a disseminação metastática de células de melanoma através do controle da expressão de Beta-3-integrina e da expressão da matriz metaloproteinase (DANKORT et al. 2009; SMALLEY 2010).

DANKORT et al. (2009) observaram que apenas a mutação em BRAF não é suficiente para o desenvolvimento de melanoma, mas, quando associada com o silenciamento de PTEN, leva ao desenvolvimento da doença com 100% de penetrância, curta latência e metástase em linfonodos

e fígado.

GOYDOS et al. (2005) encontraram diferenças entre os diferentes níveis de progressão do melanoma primário em relação às mutações em BRAF / NRAS. Observaram menor incidência de metástase dérmica do que de metástase à distância em 77% dos casos de melanoma que apresentavam uma dessas mutações; metástases à distância ocorreram em 11 dentre 12 casos. Interessantemente, metástase nodal foi a menos frequente entre os casos com mutação V599E em BRAF (40%). Quando estudadas amostras do mesmo paciente, a mesma mutação foi encontrada em diferentes segmentos do tumor, demonstrando diferentes níveis de progressão. Uma maneira de interpretar esse fato seria imaginar o tumor primário como um mosaico contendo diversas mutações, e que mutações em MAPK não seriam necessárias para metástase nodal (GOYDOS et al. 2005).

Há também a possibilidade de a via BRAF/MAPK permitir que células de melanoma escapem da vigilância imunológica por meio da supressão de antígenos pigmentares altamente imunogênicos (SMALLEY 2010).

A) RAS

Há três moléculas no gene proto-oncogênico RAS, ou seja, HRAS, KRAS e NRAS (DHOMEN e MARAIS 2009; IBRAHIM e HALUSKA 2009; INAMDAR et al. 2010).

Ao contrário do que se observa em outros tumores sólidos, mutações em RAS ocorrem com pouca frequência (15%) em melanomas (FECHER et

al. 2008; IBRAHIM e HALUSKA 2009; INAMDAR et al. 2010). Dos membros da família RAS, as mutações em NRAS são as que mais ocorrem nos melanócitos, com taxas que se aproximam a 56% em nevos congênitos, 33% no melanoma primário, e 26% em melanoma metastático (IBRAHIM e HALUSKA 2009; ROTHER e JONES 2009). Mutações em NRAS foram encontradas em 5,6 % de nevos comuns (POYNTER et al. 2006). FECHER et al. (2008) não observaram essa mutação em melanomas não cutâneos (incluindo primário cerebral, uveal e de mucosa) e de partes moles.

Em pacientes com melanoma, mutações em KRAS e em HRAS foram encontradas em 2% e 1% dos casos, respectivamente (INAMDAR et al. 2010).

Alguns estudos correlacionam mutações em NRAS com metástases ou progressão da doença (IBRAHIM e HALUSKA 2009). Essas mutações em NRAS ocorrem, frequentemente, em lesões nodulares e em peles expostas ao sol, mas são raramente observadas em nevos displásicos, apesar de serem observadas em nevos congênitos (POYNTER et al. 2006; IBRAHIM e HALUSKA 2009; ROTHER e JONES 2009).

Outros estudos demonstraram mutações ativadas em HRAS associadas com inativação de p16 INK4a, p14 ARF e/ou TP53 em melanomas não metastáticos. No entanto, mutações ativadas em NRAS associadas à deficiência CDKN2A em melanócitos induzem o desenvolvimento de melanoma cutâneo, com reduzido período de latência e alta penetrância, resultando em metástases linfonodais em 30% dos casos. Portanto, as vias controladas por RAS, TP53 e CDKN2A parecem ser componentes centrais no controle do fenótipo da doença (IBRAHIM e

HALUSKA 2009; INAMDAR et al. 2010).

Já foi relatado que a expressão de RAS pode inibir supressores tumorais como p16, p53, e p14 (INAMDAR et al. 2010).

Foi observada correlação entre a presença de mutações em NRAS e tumores com níveis de Clark maiores, embora outros autores não tenham observado relação entre mutações em NRAS e BRAF e os índices de Breslow (PLATZ et al. 2008).

B) RAF

Apesar de haver três moléculas da família RAF, a saber, ARAF, BRAF, CRAF, atualmente a mais importante delas na sinalização de melanoma é a BRAF (DHOMEN e MARAIS 2009; IBRAHIM e HALUSKA 2009; PALMIERI et al. 2009).

Estudos demonstram que mutações em BRAF ocorrem em torno de 50% a 70% dos casos de melanomas malignos (SEKULIC et al. 2008; RUSSO et al. 2009; IBRAHIM e HALUSKA 2009; SMALLEY 2010; INAMDAR et al. 2010). Localizado no cromossomo 7q34, BRAF é expresso na maioria dos tecidos; seus níveis de expressão são mais elevados nos tecidos neuronais e testiculares (IBRAHIM e HALUSKA 2009).

Ao contrário de ARAF e CRAF, que requerem fosforilação no terminal N além da ativação pelo RAS, o terminal N de BRAF é constitutivamente ativado, exigindo apenas que RAS o ative. Pelo fato de BRAF requerer menos passos para a ativação, é possível que possa ser ativado em diversas condições, e que seja o principal isoforme responsável pela

sinalização entre RAS e MEK na maioria das células (IBRAHIM e HALUSKA 2009).

Mutações em CRAF e ARAF são raras em câncer, provavelmente pelo fato de que seriam necessárias duas mutações para a ativação dos oncogenes CRAF e ARAF (PALMIERI et al. 2009).

A mutação somática V600E em BRAF não ocorre apenas em melanomas (em até 66% dos casos), mas também é comum em câncer de tireoide papilar (45%), carcinoma seroso de baixo grau de ovário (30%) e carcinomas colorretais (HOUBEN et al. 2009; IBRAHIM e HALUSKA 2009; PALMIERI et al. 2009). A mutação V600E em BRAF aumenta 480 vezes a atividade do gene BRAF (IBRAHIM e HALUSKA 2009).

A substituição do ácido glutâmico por valina na posição 600 representa mais de 90% das mutações em BRAF em melanoma e é, de longe, a mutação mais importante funcionalmente (FECHER et al. 2008; IBRAHIM e HALUSKA 2009; RUSSO et al. 2009; SMALLEY 2010).

A mutação V600E em BRAF é observada em cerca de 82% dos nevos benignos, frequência maior do que a encontrada em melanomas, o que sugere um evento precoce de mutações que, por si só, não é suficiente para a transformação maligna (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; FECHER et al. 2008; IBRAHIM e HALUSKA 2009; SEKULIC et al. 2008; PALMIERI et al. 2009; SMALLEY 2010). Taxas similares foram observadas em diferentes tipos histológicos de nevos (incluindo os congênitos, intradérmicos, compostos e atípicos), o que sugere que a ativação de BRAF não contribui para o entendimento das diferentes propensões de cada subtipo de nevos a

evoluir para melanoma (PALMIERI et al. 2009; ROTHER e JONES 2009).

Já se observou que mutações em BRAF são menos frequentes em melanomas em estágio precoce do que em estágios avançados, o que contradiz a hipótese de que essa mutação participaria da iniciação do melanoma; por outro lado, corrobora com a hipótese de que essas mutações estariam envolvidas na progressão da doença (PALMIERI et al. 2009). Considerando essas afirmações, pode-se inferir que mutações em BRAF induziriam a proliferação e a sobrevivência celular (PALMIERI et al. 2009).

Embora a mutação V600E em BRAF seja um evento precoce na gênese do melanoma, ela não é suficiente para transformar nevos em células de melanoma (KANNENGIESSER et al. 2008; HOUBEN et al. 2009; IBRAHIM e HALUSKA 2009; SMALLEY 2010). Em vez disso, a expressão de BRAF V600E nos melanócitos humanos leva à irreversível parada de crescimento e senescência característica (KANNENGIESSER et al. 2008; PALMIERI et al. 2009; SMALLEY 2010).

Essa mutação em BRAF induz esse processo, denominado "senescência oncogene-induzida", por meio do aumento da expressão de p16 CDKN2A, que é um importante mecanismo na proteção contra a transformação maligna das células (PALMIERI et al. 2009; SMALLEY 2010). Como a perda ou mutação do gene p16 é um evento comum em algumas formas herdadas de melanoma, foi inicialmente proposto que mutações em BRAF ocorressem com a inativação de p16. Curiosamente, esse não parece ser o caso de melanoma em desenvolvimento, com expressão de p16 em nevos em mosaico e de aparência (SMALLEY 2010).

A mutação em BRAF também é mais frequente em pacientes jovens ao diagnóstico (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; ROTHER e JONES 2009) e naqueles com metástase linfonodal (essa mutação é menos frequentemente encontrada em tumores satélites ou metástases viscerais) (ROTHER e JONES 2009). A idade ao diagnóstico é significativamente menor em pacientes com mutação em BRAF em relação àqueles em que são detectadas mutações em NRAS, o que pode estar relacionado com a associação entre NRAS e exposição solar (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; PLATZ et al. 2008).

POYNTER et al. (2006) observaram que a média de idade ao diagnóstico de melanoma em pacientes com mutação em BRAF foi de 58,4 anos. Esses autores não observaram associação entre presença de mutações em BRAF e gênero dos pacientes, cor de cabelo, cor dos olhos, tipo de pele, número de nevos, nível de Breslow e ulceração. A maioria das mutações em BRAF foi encontrada em melanomas superficiais e nos associados a nevos; entretanto, nenhuma mutação foi encontrada em melanomas lentiginosos e nos do tipo nodular (POYNTER et al. 2006).

KANNENGIESSER et al. (2008) não observaram diferenças na sobrevida de pacientes com ou sem mutações em BRAF, mas relatam que essas mutações contribuem para o processo inicial da melanogênese.

HOUBEN et al. (2009) demonstraram que a presença de mutação no tumor primário não teve impacto na progressão livre da doença; entretanto, encontraram associação significativa entre mutações em BRAF/NRAS e pior prognóstico, por exemplo, quanto à diminuição da sobrevida, quando

consideradas metástases. Em 57,5% de melanomas com mutações em BRAF ou NRAS, mutações em tumores metastáticos (66,3%) foram observadas mais frequentemente do que em primários (50,9%) (HOUBEN et al. 2009).

Análises em linhagens celulares de melanoma demonstraram que aquelas com mutações em BRAF não têm mutações em NRAS (IBRAHIM e HALUSKA 2009; ROTHER e JONES 2009). Essa relação também foi observada em nevos, melanomas primários e metastáticos (IBRAHIM e HALUSKA 2009). Mutações em NRAS ou BRAF são mutuamente exclusivas e estão presentes em mais de 90% dos melanomas (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; POYNTER et al. 2006).

Análise de 126 melanomas primários revelou que 81% deles têm mutações em BRAF ou em NRAS, e que essas mutações ocorrem sobre a pele sem exposição crônica ao sol (HOUBEN et al. 2009; IBRAHIM e HALUSKA 2009; PALMIERI et al. 2009).

ROTHER e JONES (2009) observaram que linhagens celulares de melanoma com mutações ativadas em NRAS trocam sua sinalização de BRAF para CRAF. Essa troca é acompanhada por sinalização desregulada de cAMP, o que permite a ativação de CRAF e, conseqüentemente, a sinalização para MEK (IBRAHIM e HALUSKA 2009). Em melanócitos em condições normais de crescimento, CRAF é mantida em estado latente e não pode ser ativada. Sob condições que favorecem a diferenciação de melanócitos, resíduos S43 e S233 em CRAF se tornam desfosforilados e, assim, permitem a ativação de CRAF através de fatores de crescimento.

Esse sinal de troca da via CRAF em melanomas com mutação em NRAS tem importantes implicações no desenvolvimento terapêutico (IBRAHIM e HALUSKA 2009).

A alta taxa de mutações no gene BRAF em melanomas torna esse gene um alvo terapêutico atrativo (IBRAHIM e HALUSKA 2009).

Alguns estudos demonstraram o impacto de mutações em BRAF no prognóstico. Essas mutações foram associadas com diminuição da duração de resposta à quimioterapia e, quando presentes em metástases, foram correlacionadas com menor sobrevida a partir da remoção das lesões ao diagnóstico doença em estágio 4 (PLATZ et al. 2008). Linfonodos acometidos com essa alteração e/ou com alterações em múltiplos genes supressores foram correlacionados com menor sobrevida (PLATZ et al. 2008).

Estudos sobre a via MAPK em melanomas primários servem para elucidar o papel das proteínas RAS/RAF/MEK/ERK não apenas na gênese, mas, sobretudo, na evolução dessa doença.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram consultados no Arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo os prontuários de pacientes que, entre 1997 e 2007, receberam o diagnóstico de melanoma. Desses prontuários foram selecionados, conforme os critérios adotados para inclusão dos casos neste estudo, aqueles cujos pacientes apresentavam melanoma primário com espessura igual ou maior que 1,0 mm e que haviam necessariamente sido submetidos ao estudo do linfonodo sentinela. Para a inclusão desses pacientes nesta amostra, foi fundamental que as lâminas e os blocos de tecido tumoral estivessem disponíveis em quantidade suficiente para confecção do TMA.

Prontuários de pacientes com mais de um melanoma primário, com outros tipos de câncer, ou com melanomas originados de nevo congênito gigante, melanomas *in situ* ou melanomas desmoplásicos, e daqueles com história de patologia prévia predisponente, como xeroderma pigmentoso, foram excluídos da composição desta amostra.

Assim, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos para o estudo, 63 pacientes compuseram a amostra final deste estudo.

4.2.1 Protocolo de estudo

Para este estudo analítico observacional, de coorte retrospectivo, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente (Anexo 1), foram obtidos, dos prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo da Fundação Antonio Prudente de São Paulo, dados demográficos, histológicos e relativos à evolução da doença, que foram registrados em uma ficha de levantamento de dados previamente definida, conforme o Quadro 1.

Essa ficha de caracterização individual foi fundamental para aprofundar os conhecimentos da população em estudo, bem como para a obtenção das variáveis pertinentes à investigação. Embora constem dessa ficha, dados sobre o tratamento não foram analisados, já que fogem do escopo do estudo.

Quadro 1 – Informações coletadas de prontuários médicos de 63 pacientes com melanoma primário com espessura ≥ 1 mm para preenchimento de ficha de caracterização individual.

1. Dados demográficos dos pacientes	1.1 Gênero
	1.2 Idade
	1.3 Raça
	1.4 Antecedentes pessoais de melanoma
	1.5 Antecedentes familiares de melanoma
2. Dados do tumor primário	2.1 Localização do tumor primário
	2.1.1 cabeça
	2.1.2 pescoço
	2.1.3 membros superiores
	2.1.4 palmas
	2.1.5 tronco
	2.1.6 membros inferiores
	2.1.7 plantas do pé
	2.1.8 outras
	2.2 Tipo de biópsia
	2.3 Informações anátomo-patológicas
	2.3.1 tipo histológico
	2.3.2 espessura do tumor (índice de Breslow)
	2.3.3 tipo de crescimento tumoral (radial ou vertical)
	2.3.4 nível de invasão do tumor (classificação de Clark)
	2.3.5 taxa de mitoses
	2.3.6 presença de ulceração
	2.3.7 presença de satelitoses
	2.3.8 presença de regressão
	2.3.9 presença de invasão sanguínea
	2.3.10 presença de invasão linfática
	2.3.11 presença de invasão neural
3. Dados de disseminação tumoral	3.1 Pesquisa de linfonodo sentinela (positiva ou negativa)
	3.1.1 número de linfonodos acometidos
	3.1.2 localização dos linfonodos acometidos
	3.1.2.1 cervical à direita ou à esquerda
	3.1.2.2 axilar à direita ou à esquerda
	3.1.2.3 inguinal à direita ou à esquerda
	3.1.2.4 outras localizações
	3.1.3 informações da linfadenectomia
	3.1.3.1 data da cirurgia
	3.1.3.2 número total de linfonodos retirados
	3.1.3.3 número total de linfonodos positivos
4. Dados do tratamento	4.1 Tipos de tratamento (radioterapia, quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante, imunoterapia, perfusão)
	5.1 Recidivas
5. Dados da evolução dos pacientes	5.1.1 data da primeira recidiva
	5.1.2 locais de recidiva (pele e tecido subcutâneo, sistema nervoso central, fígado, ossos, outros)
	5.2 Situação do paciente na última informação registrada
	5.2.1 data da última informação registrada em prontuário
	5.2.2 vivo sem evidência da doença
	5.2.3 vivo com câncer
	5.2.4 morte decorrente do câncer
	5.2.5 morte por outras causas não relacionadas ao câncer

4.2.2 Coleta de lâminas e blocos

Foram revistos os preparados histológicos de melanomas para confirmação diagnóstica e estabelecimento dos parâmetros prognósticos, conforme estabelecido pelo Grupo Brasileiro de Melanoma e pela Sociedade Brasileira de Patologia, sob a supervisão do Dr. Gilles Landman.

4.2.3 Confeção do TMA

O microarranjo em matriz de amostras teciduais, ou *tissue microarray* (TMA), é uma técnica baseada na construção de um bloco de parafina contendo fragmentos cilíndricos de amostras teciduais ou tumorais obtidos de dezenas ou centenas de blocos de parafina originais (ANDRADE et al. 2007).

Dentre as diversas vantagens do bloco de TMA em relação ao corte tradicional, destacam-se a grande economia de reagentes e de tempo para a realização das reações; a uniformização das reações e a facilidade na interpretação comparativa dos casos de uma pesquisa; a possibilidade de repetição das reações em múltiplos níveis do bloco; a simplificação do trabalho das linhas de pesquisa pela utilização do bloco em mais de um projeto (ANDRADE et al. 2007).

A leitura das lâminas foi realizada por um mesmo patologista em microscópio ótico comum, e os resultados foram classificados em relação à intensidade da reação positiva.

Os blocos com tecido tumoral dos pacientes incluídos neste estudo foram utilizados para a construção de TMAs, e as áreas representativas dos tumores foram cuidadosamente selecionadas em lâminas coradas por HE.

As áreas tumorais selecionadas foram retiradas do bloco doador e adicionadas ao bloco receptor com auxílio do Manual *Tissue Arrayer 1* (Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, EUA). Foram utilizados dois fragmentos de cada amostra, compreendendo regiões diferentes do tumor, que foram depositados de forma coordenada no bloco receptor. Os fragmentos tumorais de 1,0 mm foram arranjados em duplicata, com intervalos de 0,2 mm entre as amostras. Os cortes seriados do bloco de TMA foram depositados em lâminas silanizadas (Starfrost®) recobertas com adesivo e submetidas à fixação por UV (Instrumedics Inc®, Hackensack, NJ, EUA). Posteriormente, as lâminas passaram por um banho de parafina e foram armazenadas em temperatura de -20°C no freezer antes de serem analisadas por técnicas histoquímicas.

A partir do corte original corado em HE, as áreas do tumor foram marcadas com caneta orientando-se, dessa maneira, onde deveria ser realizada a punção no bloco doador. O cilindro de tecido retirado do bloco doador foi transferido para bloco receptor. A maior preocupação na utilização do TMA foi a representação da lesão, considerando a pequena amostra estudada.

A partir dos blocos de TMA, foram realizados cortes histológicos seriados em lâmina de vidro que foram utilizados para as reações imuno-histoquímica das proteínas da via em estudo.

4.2.4 Imuno-histoquímica (IHQ)

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas de modo

automatizado na plataforma Benchmark[®], *Ventana Medical Systems* (Illkirch, Cedex, França). Esse aparelho é utilizado para melhor diluição, recuperação antigênica, revelação e cromógeno do anticorpo. Todas as etapas foram executadas pela máquina, a saber: desparafinização, re-hidratação, recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena, reação com anticorpo primário e secundário e revelação.

Essa plataforma utiliza os seguintes reagentes:

1 Fluidos volumosos

- EZ PREP: solução de desparafinização patenteada pela *Ventana Medical Systems*, livre de álcool e xilol, cuja formulação dos reagentes não está disponível. É adicionada às placas aquecidas em que são depositadas as lâminas para o processo de desparafinização.

- LCS (*Liquid Coversli*): solução oleosa de baixa densidade responsável por formar uma câmara de reação sobre a lâmina, de modo a permitir a homogeneização dos reagentes e não deixar que eles evaporem e ressequem durante o processo.

- CC1 (*Cell Conditioning One*): solução tampão de pH levemente alcalino à base de TRIS usada como pré-tratamento no processamento de tecidos. Quando em alta temperatura, é capaz de romper as ligações covalentes formadas pela formalina no tecido, permitindo a reativação antigênica e aumentando a acessibilidade ao anticorpo.

- *Reaction Buffer*: solução de tampão pH 7,4 responsável por promover ambiente aquoso para a reação imuno-histoquímica e pela lavagem das lâminas entre os vários passos da reação.

2 Kit de Detecção: *UltraView Universal DAB Detection Kit*

Trata-se de um kit contendo cinco dispensadores com tecnologia baseada em um sistema de detecção por multímeros para detecção sensível e específica de anticorpos primários de coelho e camundongo. O kit é livre de biotina, eliminando a marcação inespecífica proveniente da biotina endógena. Além dos componentes do kit de detecção, no momento da realização da técnica são acoplados ao *rack* dois outros dispensadores:

- Hematoxilina de Mayer's modificada;
- *Bluing Reagent*: solução aplicada após a hematoxilina para a sua contracoloração.

3 Anticorpos

Os anticorpos utilizados para a pesquisa do RAS (*rabbit polyclonal antibody*, Neo Markers, CA, USA) produzem coloração de padrão citoplasmático e de membrana.

Os anticorpos utilizados para a pesquisa do RAF (clone pS338 DPR/2/2 A/3 A, *rat monoclonal antibody*, Neo Markers, CA, USA) produzem coloração de padrão nuclear.

Os anticorpos utilizados para a pesquisa do ERK (clone E337, *rabbit monoclonal antibody*, Epitomics, CA, USA) produzem coloração de padrão citoplasmático.

Os anticorpos utilizados para a pesquisa do MEK (clone ab 78235, *rabbit monoclonal antibody*, Abcam, CA, USA) produzem coloração de padrão citoplasmático.

A) Avaliação das reações de Imuno-histoquímica

As 63 amostras submetidas às reações imuno-histoquímicas foram interpretadas a partir de padronização semiquantitativa, de acordo com a intensidade da reação e com a porcentagem de tecido tumoral com coloração positiva para a presença do anticorpo. Desse modo, estabeleceram-se as seguintes graduações de intensidade:

- +1: quando a reação imuno-histoquímica se apresentou com leve intensidade nas células neoplásicas;
- +2: quando a reação imuno-histoquímica se apresentou com intensidade moderada nas células neoplásicas;
- +3: quando a reação imuno-histoquímica se apresentou com forte intensidade nas células neoplásicas.

Com relação à porcentagem de tecido tumoral com coloração positiva para a presença do anticorpo, foram estabelecidas as seguintes graduações:

- +1: reação observada em menos de 10% do tecido tumoral;
- +2: reação observada em 10% a <40% do tecido tumoral;
- +3: reação observada em 40% a <60% do tecido tumoral;
- +4: reação observada em 60% a 100% do tecido tumoral.

Os escores de intensidade de coloração e de porcentagem tumoral com coloração positiva em cada uma das amostras do TMA foram somados, e o resultado dessas somas determinou negatividade (escores 0 a <2) ou positividade (escores 2 a 7) para o anticorpo analisado.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram tabulados em planilha do programa *Excel/ 9.0 for Windows*, e depois transformados em valores descritivos, tanto como frequências (variáveis qualitativas) quanto como medidas-resumo, ou seja, média, desvio-padrão e valores mínimo e máximo (variáveis quantitativas). Valores expressos em médias e desvios-padrão foram comparados com o emprego do Teste *t* de Student.

Foram construídas curvas de Kaplan-Meier para análise univariada da sobrevida, e a comparação dessas curvas foi analisada com a aplicação do teste de *log-rank*.

Para os cálculos estatísticos, foi utilizado o programa livre R, disponível em www.r-project.org. Adotou-se probabilidade de rejeição da hipótese de 5% para determinação da significância dos achados ($p \leq 0,050$).

5 RESULTADOS

5.1 ACHADOS CLÍNICO-DEMOGRÁFICOS

Na Tabela 1 está apresentada a distribuição das frequências dos achados clínico-demográficos da população estudada. A idade dos 63 pacientes ao diagnóstico da doença variou entre 21 e 85 anos, com média de $55,3 \pm 15,7$ anos e mediana de 56 anos. Essas médias foram similares ($p = 0,574$) quando comparados pacientes do gênero masculino ($57,8 \pm 16,0$ anos) e feminino ($55,3 \pm 18,8$ anos).

Ressalte-se que dados sobre antecedentes pessoais e familiares de melanoma não estavam registrados em quantidade importante de prontuários (respectivamente, 32 e 35 prontuários).

Tabela 1 - Distribuição das frequências relativas aos achados clínico-demográficos em amostra de 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1,0 mm.

Dados clínico-demográficos	n	%
Gênero		
Feminino	29	46,0%
Masculino	34	54,0%
Antecedentes pessoais de melanoma		
Não	30	97,0%
Sim	1	3,0%
Antecedentes familiares de melanoma		
Não	28	93,3%
Sim	2	6,7%

5.2 LOCALIZAÇÃO DOS TUMORES

Na Tabela 2 se encontram as frequências relativas à localização dos tumores primários. O tronco e os membros inferiores foram as localizações acometidas com maior frequência. Em cinco prontuários não havia registro da localização do tumor primário.

Tabela 2 - Distribuição das frequências relativas à localização dos tumores primários em amostra de 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1,0 mm.

Localização do tumor primário	n	%
Cabeça	5	8,6%
Pescoço	1	1,7%
Membros superiores	10	17,2%
Tronco	17	29,3%
Membros inferiores	17	29,3%
Planta do pé	7	12,1%
Outra	1	1,7%

5.3 ACHADOS CIRÚRGICOS

Conforme apresentado na Tabela 3, dentre os casos de linfonodo sentinela positivo, 11 se referiam a linfonodo cervical direito (18,6%); três, a linfonodo cervical esquerdo (5,1%); 14, a linfonodo na axila direita (23,7%); 11, na axila esquerda (18,6%); 12, à linfonodo na região inguinal direita (20,3%); oito casos, na esquerda (13,6%). Esse dado não foi registrado para quatro. Foram submetidos à linfadenectomia 33 pacientes (55,9%); em 26 (44,1%) deles, a linfadenectomia não foi realizada. Não havia informação sobre a realização ou não do procedimento em quatro prontuários. Nenhum

paciente realizou tratamento neoadjuvante em decorrência do tumor primário, e 14 realizaram terapia adjuvante.

Tabela 3 - Distribuição das frequências relativas aos achados cirúrgicos em amostra de 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1,0 mm.

Variáveis	Categoria	n	(%)
Local do linfonodo sentinela	Cervical esquerdo	11	18,6%
	Cervical direito	3	5,1%
	Axila direita	14	23,7%
	Axila esquerda	11	18,6%
	Inguinal direita	12	20,3%
	Inguinal esquerda	8	13,6%
	Não informado	4	
Linfadenectomia	Não realizada	26	44,1%
	Realizada	33	55,9%
	Não informado	4	
Tratamento Neoadjuvante	Não	57	100,00
	Não informado	6	
Tratamento Adjuvante	Não	43	75.44
	Sim	14	24.56
	Não informado	6	

5.4 ACHADOS ANÁTOMO-PATOLÓGICOS

Na Tabela 4 está a distribuição das frequências relativas aos achados anátomo-patológicos neste grupo de pacientes. Ressalte-se que não havia registro sobre o crescimento tumoral em quatro casos; sobre o Índice de Clark, em seis; sobre o índice mitótico, em cinco; sobre presença de ulceração, em oito; sobre regressão, em dois; sobre invasão sanguínea, em dois, sobre invasão linfática, em dois; e sobre satelitoses, também em dois.

Com relação ao tipo histológico, nos tumores do tipo superficial a

média de espessura foi de $2,18 \pm 1,90$ mm; nos do tipo acral, $4,59 \pm 4,37$ mm; e nos do tipo nodular, $4,72 \pm 1,70$ mm. Os tumores classificados em outros tipos histológicos foram os mais espessos (média de $6,35 \pm 0,21$).

Dos 63 casos estudados, um (1,8%) apresentava Clark I, e um outro (1,8%), Clark II. Clark III, IV e V foram observados, respectivamente, em 30 (52,8 %), 20 (35,1%) e cinco (8,8%) casos.

A maior média relativa à espessura dos tumores foi observada naqueles localizados em cabeça ($4,16 \pm 3,40$ mm), seguidos dos tumores primários em planta do pé ($3,89 \pm 4,53$ mm), tronco ($3,00 \pm 2,00$ mm), membros inferiores ($2,99 \pm 2,17$ mm) e membros superiores ($2,76 \pm 1,80$ mm). Ainda em relação à espessura do tumor, Breslow variou entre 0,5 e 14 mm, com média de $3,08 \pm 2,54$ mm e mediana de 2,3 mm. Embora a variância desses valores tenha sido significativamente maior no grupo feminino ($F = 5,60$; $p = 0,030$), não houve diferença ($p = 0,856$) entre as médias da espessura do tumor para homens ($3,00 \pm 2,00$ mm) e mulheres ($2,90 \pm 3,00$ mm).

Crescimento vertical da lesão foi registrado para 56 casos (94,9%); somente em dois casos (3,4%), o crescimento era radial; em um caso não se observou crescimento.

O índice mitótico foi outro aspecto estudado. Em 38 casos, esse índice foi de 0 a 5 mitoses em 10 CCG (campos de grande aumento); em 13 pacientes, esse índice foi de 6 a 10 mitoses em 10 CCG e, em sete pacientes, de 11 a 21 mitoses em 10 CCG.

Tabela 4 - Distribuição das frequências relativas aos achados anátomo-patológicos em amostra de 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1,0 mm.

Dados anátomo-patológicos		n	%
Tipo histológico	Superficial	39	65,0%
	Nodular	11	18,3%
	Acral	8	13,3%
	Outros	2	3,4%
Crescimento tumoral	Vertical	56	94,9%
	Radial	2	3,4%
	Sem crescimento	1	1,7%
Índice de Clark	II	2	3,5%
	III	30	52,7%
	IV	20	35,1%
	V	5	8,7%
Índice mitótico	0 a 5 / 10 CGA	38	65,5%
	6 a 10 / 10 CGA	13	22,4%
	11 a 21 / 10 CGA	7	12,1%
Ulceração	Presente	17	30,9%
	Ausente	38	69,1%
Regressão	Presente	0	-
	Ausente	61	100,0%
Invasão sanguínea	Presente	0	-
	Ausente	61	100,0%
Invasão linfática	Presente	5	8,2%
	Ausente	56	1,8%
Satelitoses	Presentes	2	3,3%
	Ausentes	59	96,7%

Ulceração não foi apresentada por 38 pacientes (69,1%), e estava presente em oito casos (16%). Nos 61 casos (100%) em que constava a informação, não havia presença de regressão. Não foi observada infiltração sanguínea em 61 casos (100%). Invasão linfática foi constatada em cinco casos (8,2%), e estava ausente em 56 casos (91,8%). Satelitoses estavam

ausentes em 59 casos (96,7%), enquanto a sua presença foi identificada em dois casos (3,28%).

5.5 ACHADOS DE DISSEMINAÇÃO TUMORAL

Segundo os dados coletados de 58 prontuários médicos em que constava a informação, todos os pacientes foram submetidos à biópsia do linfonodo sentinela que se mostrou positiva para 18 pacientes (31,0%).

Em apenas sete desses casos havia registro da localização do linfonodo sentinela, ou seja, em três pacientes, o linfonodo sentinela se localizava na região inguinal esquerda; nos demais quatro pacientes, localizava-se, cada um, na região inguinal direita, cervical direita, axilar direita ou axilar esquerda.

No total, 33 pacientes foram submetidos à linfadenectomia, e em quatro prontuários não havia essa informação.

5.6 ACHADOS RELATIVOS À EVOLUÇÃO DOS PACIENTES

O tempo médio de seguimento desta amostra foi de $47,98 \pm 26,82$ meses (variação de um a 110 meses).

Em 23 casos (37,7%) dentre os 61 em cujos prontuários havia registro da informação, houve recidiva do tumor primário após tempo médio de $19,93 \pm 12,46$ meses (variação de um a 43 meses). A distribuição das frequências relativas à localização dessas recidivas está apresentada na

Tabela 5. Ressalte-se que em dois casos não havia o registro da localização da recidiva.

Tabela 5 - Distribuição das frequências relativas à localização de recidivas em 21 dentre 63 pacientes com melanoma de espessura igual ou maior que 1,0 mm.

Localização das recidivas	n	%
Pele	6	28,6%
Pele e fígado	1	4,8%
Pele e ossos	1	4,8%
Pele + SNC + Outras	1	4,8%
Pele + SNC + Fígado + Ossos + Outras	1	4,8%
Pele + Outras	5	23,7%
SNC + Outras	2	9,5%
Outras	4	19,0%

Seis pacientes (10,5%) faleceram em tempo médio de $27,0 \pm 21,0$ meses (variação de dois a 48 meses). Outros 15 pacientes (26,3%) estavam vivo com a doença em seguimento registrado de $34,1 \pm 26,0$ meses (variação de um a 81 meses), e os demais 36 (63,2%) estavam vivos livre da doença em seguimento de $57,7 \pm 24,0$ meses (variação de um a 110 meses). Informações sobre a evolução do paciente não constavam em seis prontuários.

5.7 ACHADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

A distribuição das frequências relativas aos escores finais observados no estudo imuno-histoquímico da expressão proteica em melanomas primários com espessura $\geq 1,0$ está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Distribuição das frequências absolutas relativas aos escores finais observados no estudo imuno-histoquímico das proteínas RAS (membrana e citoplasma), RAF (núcleo), MEK (citoplasma) e ERK (citoplasma).

Proteínas	Escore final / Marcação							
	0	2	3	4	5	6	7	9*
RAS (membrana)	49	1				1	1	11
RAS (citoplasma)	44	1	2	1	1	2	1	11
RAF (núcleo)	17			1	2	5	23	15
MEK (citoplasma)	2	1		4	6	20	10	20
ERK (citoplasma)	16	1	2	7	9	9	5	14

(*) Marcação 9 se refere a blocos em que não havia tecido tumoral (considerada perda de material).

Na grande maioria das amostras, não houve expressão de RAS em membrana (49/53 amostras; 92%) nem em citoplasma (44/53 amostras; 83%). Imagens fotográficas das lâminas de TMA para expressão positiva e negativa de RAS em melanomas com espessura ≥ 1 mm podem ser vistas na Figura 2.

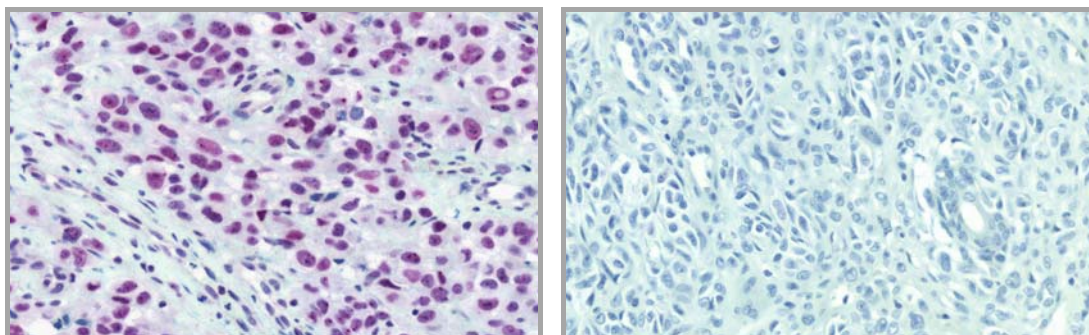


Figura 2 - Imagens fotográficas da lâmina de TMA com expressão positiva (à esquerda) e negativa (à direita) de RAS. (Aumento de 200x).

A expressão de RAF de padrão nuclear foi positiva em 31/43 amostras (72,0%). Dos casos em que foi possível avaliar RAF em membrana, a sua expressão foi negativa em 100% das amostras. Imagens fotográficas das lâminas de TMA para expressão positiva e negativa de RAF em melanomas com espessura ≥ 1 mm podem ser vistas na Figura 3.

As expressões de MEK citoplasmático e de ERK citoplasmático foram positivas, respectivamente, em 41/43 (95,0%) e em 33/49 (67,0%) das amostras. Imagens fotográficas das lâminas de TMA para expressão positiva e negativa de MEK e ERK em melanomas com espessura ≥ 1 mm podem ser vistas nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

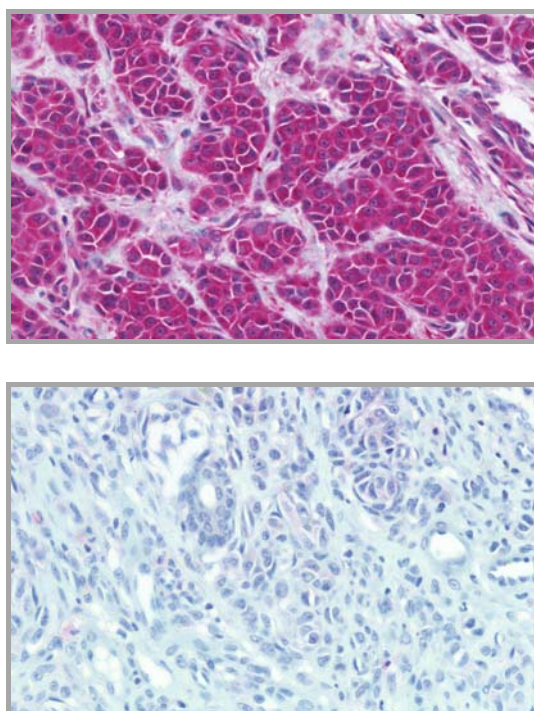


Figura 3 - Imagens fotográficas da lâmina de TMA com expressão positiva (à esquerda) e negativa (à direita) de RAF. (Aumento de 200x).

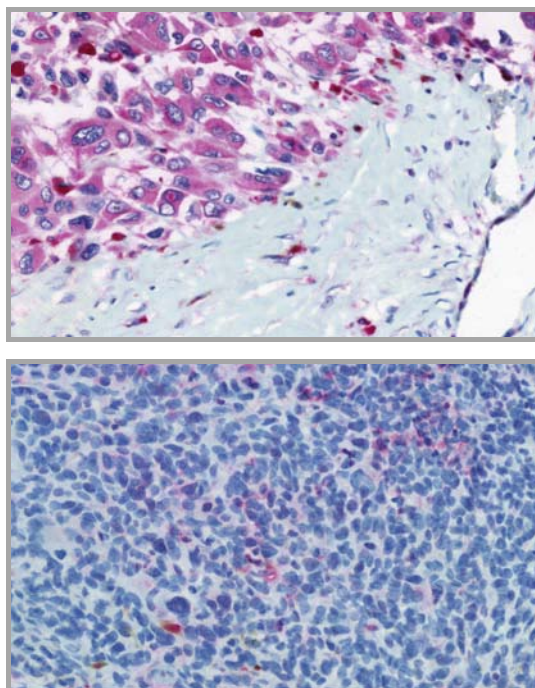


Figura 4 – Imagens fotográficas da lâmina de TMA com expressão positiva (à esquerda) e negativa (à direita) de MEK. (Aumento de 200x).

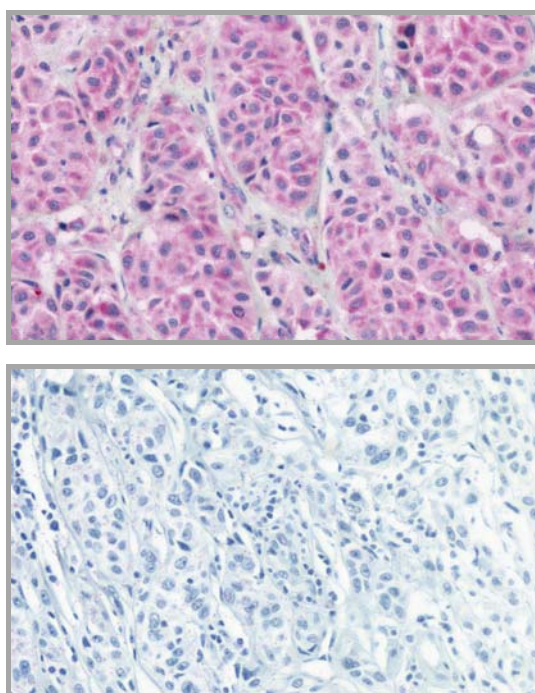


Figura 5 – Imagens fotográficas da lâmina de TMA com expressão positiva (à esquerda) e negativa (à direita) de ERK. (Aumento de 200x).

Na Figura 6 está ilustrada a distribuição das amostras não avaliadas e das positivas e negativas para as proteínas avaliadas.

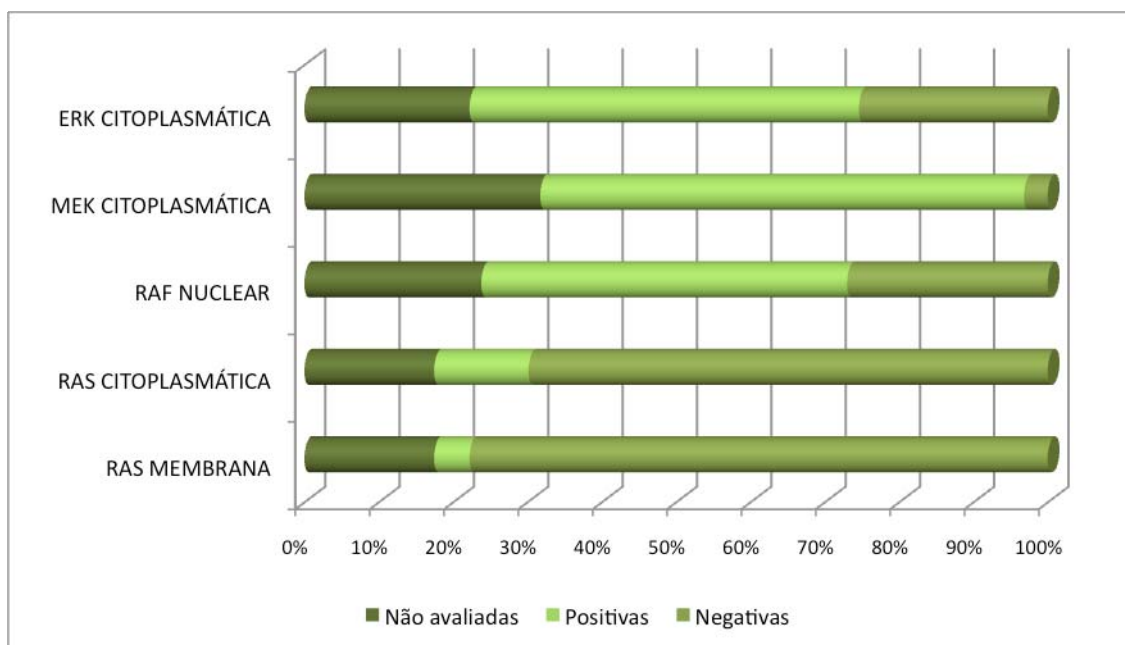


Figura 6 - Representação gráfica da distribuição das amostras não avaliadas, positivas e negativas para as proteínas da via MAPK (RAS/RAF/MEK/ ERK).

5.8 INFLUÊNCIA DOS ACHADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS NA SOBREVIDA DOS PACIENTES

Para o cálculo do tempo de sobrevida livre de doença foram consideradas a data da biópsia e a data da recidiva e/ou óbito por melanoma.

O tempo de seguimento médio foi de 46 meses e, em cinco anos, as taxas de sobrevida câncer-específica e livre de doença foram 83% e 64%, respectivamente.

Apenas as marcações de RAF nuclear, RAS citoplasmática e ERK citoplasmática puderam ser associadas ao tempo de sobrevida, uma vez que as marcações de RAS em membrana, de RAF em membrana e de MEK citoplasmática foram bem definidas, ou seja, as expressões de RAS e RAF em membrana foram negativas, enquanto a expressão de MEK citoplasmática foi positiva.

A análise do risco relativo (RR) para sobrevida câncer-específica em casos de melanoma primário com espessura igual ou maior que 1 mm não evidenciou achados significativos, embora tenha se observado RR de 2,65, 4,20 e 3,58, respectivamente, para casos de positividade para RAS citoplasmática, RAF nuclear e ERK citoplasmática (Tabela 7). Do mesmo modo, a análise do risco relativo (RR) para sobrevida livre da doença tampouco evidenciou achados significativos, embora tenha se observado RR de 2,09, 1,78 e 2,32, respectivamente, para casos de positividade para RAS citoplasmática, RAF nuclear e ERK citoplasmática (Tabela 8). Esses dados indicam que ERK citoplasmática positiva parece ter sido a proteína da via de sinalização MAPK que mais influenciou a sobrevida tanto câncer-específica quanto livre da doença.

Tabela 7 - Risco relativo (RR) de sobrevida câncer-específica em casos de melanoma primário com espessura igual ou maior que 1 mm em relação à expressão das proteínas RAS citoplasmática, RAF nuclear e ERK citoplasmática.

		<i>Taxa de sobrevida câncer- específica</i>	<i>RR</i>	<i>Intervalo de Confiança IC = (95%)</i>	<i>Valor de p</i>
RAS citoplasma	Negativa	84%	1	0 – inf.	0,30
	Positiva	100%	2,65		
RAF núcleo	Negativa	78%	1	0,38 – 46,52	0,20
	Positiva	94%	4,20		
ERK citoplasma	Negativa	71%	1	0,59 – 21,55	0,14
	Positiva	90%	3,58		

Tabela 8 - Risco relativo (RR) de sobrevida livre da doença em casos de melanoma primário com espessura igual ou maior que 1 mm em relação à expressão das proteínas RAS citoplasmática, RAF nuclear e ERK citoplasmática.

<i>Variáveis</i>		<i>Taxa de sobrevida livre da doença</i>	<i>RR</i>	<i>Intervalo de Confiança IC = (95%)</i>	<i>Valor de p</i>
RAS citoplasma	Negativa	65%	1	0,27 – 16,36	0,47
	Positiva	83%	2,09		
RAF núcleo	Negativa	53%	1	0,54 – 5,86	0,34
	Positiva	73%	1,78		
ERK citoplasma	Negativa	61%	1	0,66 – 8,12	0,18
	Positiva	76%	2,32		

Nas Figuras 7 a 10 estão ilustradas as curvas de sobrevida câncer-específica e as de sobrevida livre da doença em cinco anos. Análises *log rank* evidenciaram que o gênero dos pacientes e a expressão das proteínas RAS, RAF e ERK não influenciaram significativamente a evolução dos pacientes com melanoma primário com espessura igual ou maior que 1 mm.

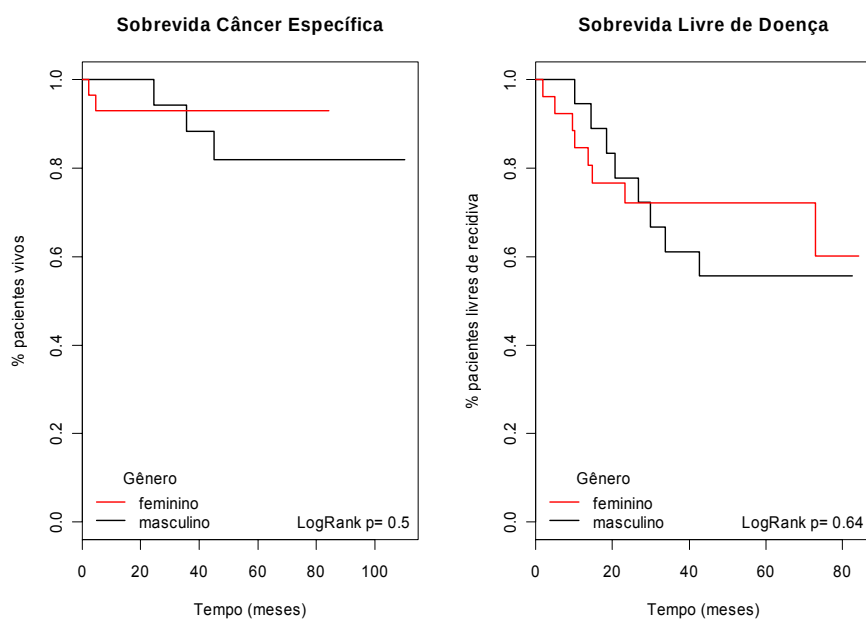


Figura 7 - Curvas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme o gênero dos pacientes.

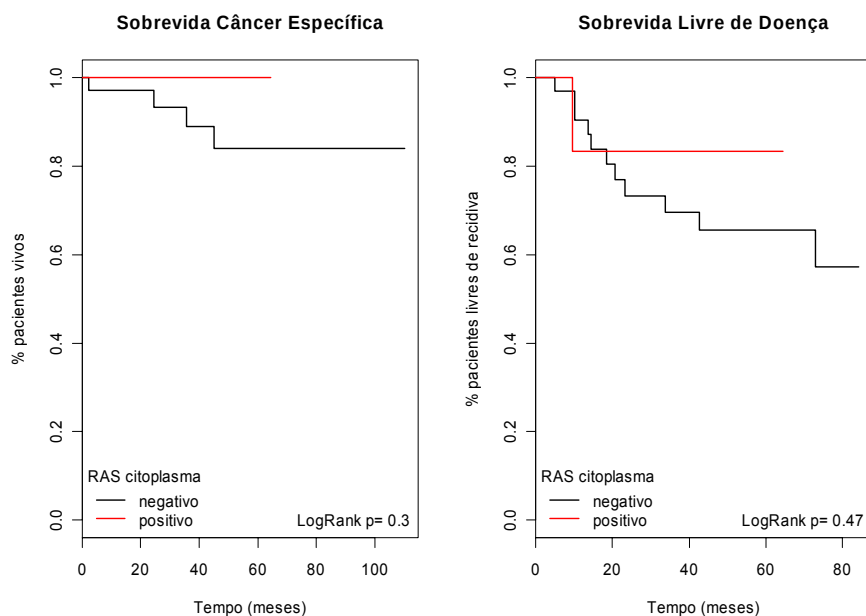


Figura 8 - Curvas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme expressão positiva ou negativa de RAS citoplasmática.

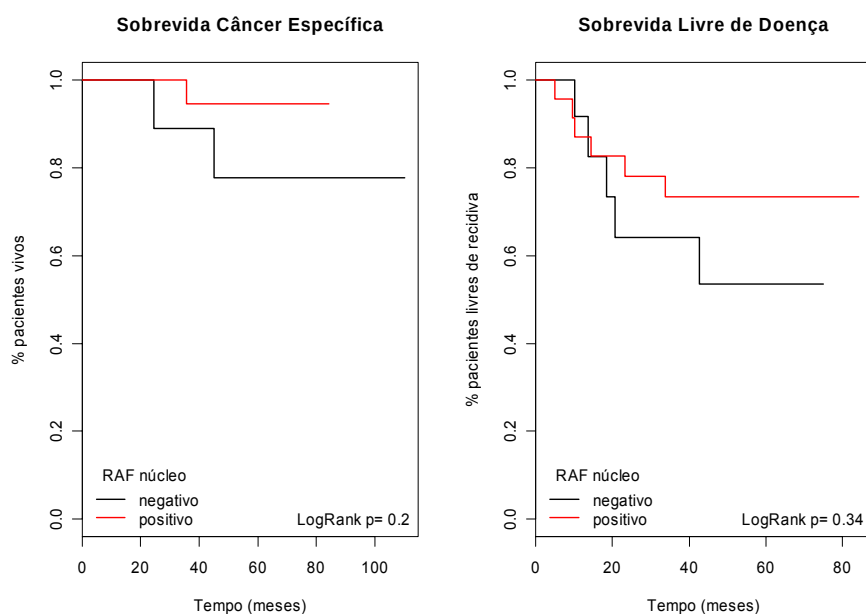


Figura 9 - Curvas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme expressão positiva ou negativa de RAF nuclear.

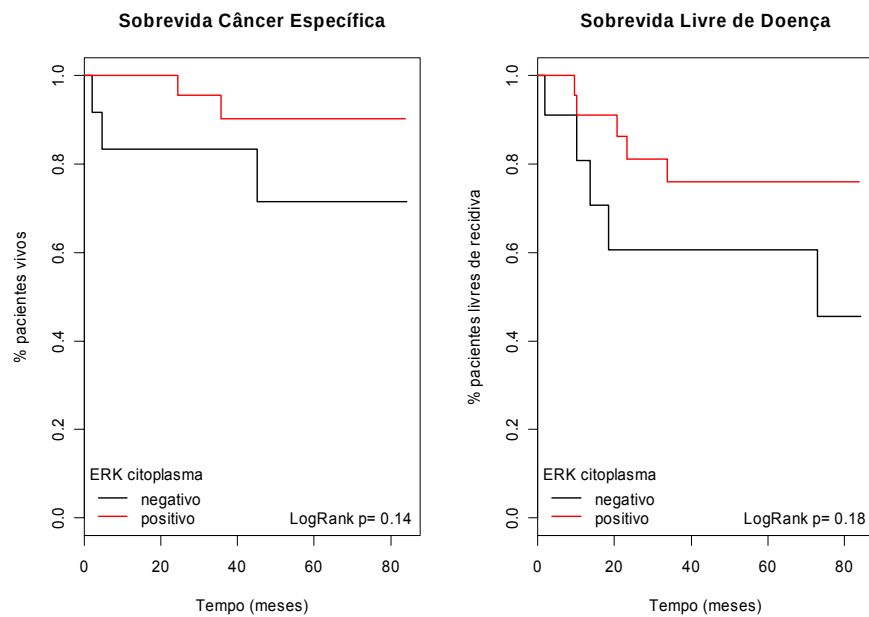


Figura 10 - Curvas de sobrevida câncer-específica e de sobrevida livre da doença em cinco anos, conforme expressão positiva ou negativa de ERK citoplasmática.

6 DISCUSSÃO

Estima-se que aproximadamente 68.000 pacientes receberam diagnóstico de melanoma nos Estados Unidos da América no ano de 2010 (GERSHENWALD e ROSS 2011). No Brasil, a previsão do INCA para 2012 é de 6.230 novos casos 1.392 mortes decorrentes de melanoma (Ministério da Saúde 2012).

Na Austrália, a doença acomete um em cada 58 homens e uma em cada 25 mulheres de meia idade, afetando predominantemente caucasianos jovens e adultos de meia idade (RUSSO et al. 2009). Os homens parecem ter risco 1,5 vezes maior de desenvolver um melanoma do que a mulher, e risco duas vezes maior de morrer em decorrência da doença (CHO e CHIANG 2010). Outros estudos apontam incidência igual em homens e mulheres e incomum em crianças (BANDARCHI et al. 2010), assertiva observada também em nosso estudo, no qual houve frequência similar de pacientes de ambos os gêneros.

A incidência de melanoma tem aumentado na população branca; é menor e se mantém estável em indivíduos de pele negra. A diminuição da incidência relatada em alguns países provavelmente se deva a baixas taxas de imigração. Já o aumento dessa incidência em outras regiões pode ser explicada tanto pela detecção precoce de melanomas finos quanto pelo verdadeiro aumento de novos casos. Apesar desse aumento no número de casos de melanoma, o prognóstico tem melhorado devido ao diagnóstico

precoce, em estágios em que a doença é curável (BANDARCHI et al. 2010).

De acordo com *National Cancer Institute Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER), a média de idade ao diagnóstico é de 59 anos, e a média de idade ao óbito por melanoma é de 68 anos (CHO e CHIANG 2010), dados esses similares aos que encontramos nesta série, na qual a média de idade foi de $55,3 \pm 15,7$ anos (mediana de 56 anos).

Os fatores de risco para melanoma incluem presença de múltiplos nevos ou de nevos atípicos, história familiar e pessoal de melanoma, imunossupressão, exposição a raios ultravioleta, fotossensibilidade, particularmente quando associada com história de queimaduras solares (IBRAHIM e HALUSKA 2009; RUSSO et al. 2009; CHO e CHIANG 2010; BANDARCHI et al. 2010). Devido à falta de informações devidamente registradas nos prontuários médicos, foi inviabilizada qualquer análise, ainda que descritiva, dos fatores de risco eventualmente presentes nos pacientes que compuseram a amostra deste estudo.

A esse respeito, vale refletir sobre a importância que se deve atribuir a protocolos efetivamente orientados e adequadamente preenchidos, essenciais em prontuários médicos para que haja dados epidemiológicos precisos. Como se vê nos resultados descritivos deste estudo, uma série de dados necessários à compreensão da epidemiologia do melanoma não estava informada.

Embora a etnia possa influenciar no risco de desenvolvimento de melanoma (EDLUNDH-ROSE et al. 2006), nossos dados não permitiram contribuir para esse conhecimento, já que se encontraram apenas caucasianos,

e somente quando esse dado estava informado no prontuário médico do paciente. Considerando-se, então, que mais de 50% dos prontuários não referiam a etnia do paciente, essa informação sequer foi descrita nos resultados deste estudo.

Cerca de 9% dos pacientes com melanoma têm maior chance de desenvolver outro melanoma primário. Do mesmo modo, indivíduos com história familiar importante de melanoma têm risco aumentado em 30 a 70 vezes de desenvolver melanoma (EDLUNDH-ROSE et al. 2006). Apesar de serem fatores de risco extremamente importantes, grande número de prontuários estava incompleto em relação a esse dado.

Em relação à apresentação clínica da doença, sabe-se que, normalmente, o melanoma acomete os membros inferiores e superiores mais frequentemente em mulheres, e o dorso, em homens adultos caucasianos na quarta década de vida (BANDARCHI et al. 2010; CHO e CHIANG 2010). Embora essa distribuição dos locais acometidos pelo melanoma de acordo com o gênero dos pacientes não tenha sido realizada, o local de manifestação da doença foram membros inferiores, membros superiores e tronco em, respectivamente, 29,3%, 17,2% e 29,3% dos pacientes. BANDARCHI et al. (2010) relataram frequência de 45,3% para dorso e de 33,9% para extremidades. Em nossa amostra, a frequência de melanomas localizados em palma e planta dos pés (12,1%) e na região da cabeça e pescoço (10,3%) foi bastante próxima à relatada pelos referidos autores, ou seja, 11,9% e 10,7%, respectivamente (BANDARCHI et al. 2010).

Há três grupos de fatores que influenciam o prognóstico da doença: o patológico, o clínico e outros fatores, como alterações genéticas. O primeiro grupo inclui maior espessura do tumor, ulceração, taxa de mitose, nível de Clark, regressão, satelitoses, invasão linfática e vascular, angiotropismo, neurotropismo, presença de crescimento vertical e tipo histológico. Os fatores clínicos se referem à idade mais avançada, ao gênero masculino, à localização da lesão e à presença de metástase (BANDARCHI et al. 2010).

A histopatologia do tumor deve incluir as seguintes informações: tipo histológico, Breslow, nível de Clark, presença de microssatélites, margens cirúrgicas, número de mitoses, crescimento tumoral, regressão, ulceração, envolvimento vascular e linfático (GARBE et al. 2011). Esses dados são sempre descritos nos resultados do exame anátomo-patológico fornecidos pelo Hospital A. C. Camargo; todavia, algumas dessas informações estavam incompletas nos prontuários consultados para esta pesquisa.

Os melanomas são classificados em quatro subtipos principais: melanoma superficial, lentigo maligno, lentiginoso acral e nodular (IVAN e PRIETO 2010). Em nossa casuística, predominaram os melanomas extensivos superficiais (65%), em frequência próxima aos 70% relatados na literatura para populações caucasianas (IBRAHIM e HALUSKA 2009; PALMIERI et al. 2009, GARBE et al. 2010).

De fato, o melanoma extensivo superficial é o tipo mais prevalente na população caucasiana, principalmente em peles com exposição intermitente ao sol, e é caracterizado por um crescimento radial lateral (IBRAHIM e HALUSKA 2009; PALMIERI et al. 2009, GARBE et al. 2010). No entanto,

nesta amostra predominaram melanomas de crescimento vertical, o que, provavelmente, se deva ao critério de seleção dessa amostra, na qual foram incluídos apenas melanomas com espessura igual ou maior do que 1 mm.

A definição das fases de crescimento radial e vertical é baseada no conceito de que a progressão do tumor implica em diferentes etapas evolutivas que podem ser identificadas no exame histológico e predizer o potencial metastático do tumor. Por definição, melanomas *in situ* têm apenas a fase de crescimento radial. Fase de crescimento vertical tem sido definida como tumorigênica quando o crescimento dos ninhos dérmicos são maiores do que qualquer ninho no componente juncional da lesão, ou quando podem ser identificadas mitoses dentro dos melanócitos dérmicos. Crescimento vertical pode estar relacionado ao volume do tumor; um melanoma com ninhos de células tumorais na derme provavelmente terá maior potencial metastático do que um tumor com algumas células na derme, mesmo que tenham a mesma espessura de acordo com Breslow (IVAN e PRIETO 2010). Neste estudo, 94,9% dos tumores apresentaram crescimento vertical, o qual se correlaciona com maior potencial metastático do melanoma (IVAN e PRIETO 2010), para uma taxa de metástases de 37,7% em tempo médio de 19 meses.

Há cinco níveis de invasão do melanoma propostos por CLARK et al. (1969), a saber: o nível I se refere a melanoma *in situ*; o nível II, à invasão da derme papilar superficial; o nível III, a melanoma invasivo, que preenche e expande a derme papilar; o nível IV, à invasão da derme reticular; e o nível V se refere à infiltração em tecido adiposo subcutâneo. Embora esses níveis

de invasão já tenham sido correlacionados com a sobrevida dos pacientes (CLARK et al. 1969), essa relação não se aplica ao prognóstico, ainda que algumas instituições indiquem o exame do linfonodo sentinela mediante a detecção de nível IV de Clark IV (IVAN e PRIETO 2010). Nesta amostra houve predomínio de melanomas com níveis de Clark III ou maior, novamente em função de o estudo ter enfatizado apenas os tumores mais espessos do que 1 mm.

Índices mitóticos altos estão associados com pior prognóstico. Na versão mais recente do AJCC (BALCH et al. 2009), a taxa de mitose emergiu como importante influência na sobrevida, substituindo, inclusive, o nível de invasão (Clark) na definição de categorias T1 (IVAN e PRIETO 2010).

A expectativa de sobrevida de pacientes com melanoma ulcerado é inferior à de pacientes com melanoma não ulcerado de mesma espessura (IVAN e PIETRO 2010). A maior parte dos pacientes desta casuística (69,1%) não apresentava ulceração, o que pode ter sinalizado melhor prognóstico para esse grupo de doentes.

A regressão pode ser reconhecida pela presença de fibrose da derme, de proliferação vascular, de infiltrado inflamatório e de melanófagos destruídos completa ou parcialmente. A regressão pode variar de focal à extensas, e a correlação entre regressão e prognóstico ainda é controversa. Em algumas instituições, é recomendada a biópsia de linfonodo sentinela quando são identificadas áreas extensas de regressão em melanomas com espessura inferior a 1 mm (IVAN e PIETRO 2010). Dos pacientes deste

estudo em cujos prontuários constava a informação, nenhum apresentou regressão.

A presença de células tumorais em vasos linfáticos é considerada pré-requisito importante para a propagação metastática do tumor. No entanto, ainda não há consenso sobre a associação entre invasão vascular associada e risco aumentado de recidiva ou ocorrência de metástase linfonodal e de metástase à distância. Essa aparente discrepância pode ser justificada pela dificuldade em se identificar a invasão linfática apenas em hematoxilina-eosina (IVAN e PIETRO 2010). Alguns tipos de melanomas, como o desmoplásico ou o de células fusiformes, têm alta propensão para a invasão perineural, motivo pelo qual se deve investigar eventual infiltração nervosa por células tumorais (IVAN e PRIETO 2010).

Microssatélites são ninhos de células metastáticas descontínuos, com diâmetro superior a 0,05 mm, e que são claramente separados por derme normal, a partir do principal componente de um melanoma invasivo, em intervalos de pelo menos 0,3 mm de distância (BALCH et al. 2010).

Nesta série de melanomas com espessura igual ou maior que 1 mm, não foi observada invasão hematogênica em nenhum caso. Microssatélites foram observados em dois casos (3,3%), e invasão linfática, em cinco (8,2%).

A via MAPK está hiperativada em grande parte dos melanomas, agindo na regulação da proliferação, invasão e sobrevivência das células tumorais (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; FECHER et al. 2008; FRIDAY e ADJEI 2008; SEKULIC et al. 2008; DHOMEN e MARAIS 2009; RUSSO et al.

2009; PALMIERI et al. 2009; SMALLEY 2010).

A via inicia com a ativação de RAS, que sinaliza o recrutamento de RAF para a membrana plasmática que, por sua vez, ativa enzima MEK, ativação essa que é seguida de fosforilação e ativação da enzima ERK. ERK regula a expressão gênica, o metabolismo e a função do citoesqueleto para controlar a proliferação, a diferenciação, o envelhecimento e a morte celular (EDLUNDH-ROSE et al. 2006; FECHER et al. 2008; FRIDAY e ADJEI 2008; SEKULIC et al. 2008; PLATZ et al. 2008; DHOMEN e MARAIS 2009; RUSSO et al. 2009; PALMIERI et al. 2009; IBRAHIM e HALUSKA 2009; SMALLEY 2010; INAMDAR et al. 2010).

Ao contrário do que acontece em outros tumores sólidos, mutações em RAS não são frequentes em melanoma, sendo identificadas em 15% dos casos (FECHER et al. 2008; IBRAHIM e HALUSKA 2009; INAMDAR et al. 2010). De fato, neste estudo foram encontradas frequências de expressão positiva para RAS em membrana e citoplasma de, respectivamente, 6% e 18%, corroborando com a infrequência de sua expressão relatada na literatura.

Mutações em BRAF, por seu turno, são identificadas em torno de 50% a 70% dos melanomas malignos (RUSSO et al. 2009; IBRAHIM e HALUSKA 2009; SMALLEY 2010; INAMDAR et al. 2010). Dentre essas mutações de BRAF em melanomas, a mais frequente é a mutação V600E que, com uma única substituição de base, é responsável por 80% das mutações (POYNTER et al. 2006; FECHER et al. 2008; KANNENGIESSER et al. 2008; RUSSO et al. 2009; PALMIERI et al. 2009; IBRAHIM e HALUSKA 2009;

SMALLEY 2010).

A mutação V600E, que se refere à substituição do ácido glutâmico por valina na posição 600, representa mais de 90% das mutações em BRAF no melanoma. Essa mutação aumenta 480 vezes a atividade do gene BRAF (FECHER et al. 2008; RUSSO et al. 2009; IBRAHIM e HALUSKA 2009; SMALLEY 2010). Essa hiperatividade de BRAF parece ter sido representada, em nossa amostra, pela frequência de 65% dos casos positivos para a expressão de RAF nuclear.

A hiperativação de BRAF parece não influenciar a sobrevida câncer-específica do paciente, embora esteja associada com o processo inicial do melanoma (KANNENGIESSER et al. 2008), nem tem impacto na sobrevida livre da doença, embora esteja associada com pior prognóstico em casos de melanomas metastáticos (HOUBEN et al. 2009). Neste estudo, as taxas de sobrevida câncer-específica em cinco anos foram similares para os casos positivos e negativos para RAF nuclear (respectivamente, 94% e 78%). A mesma observação foi feita em relação às taxas de sobrevida livre da doença, o que permite inferir que RAF nuclear hiperativado, no geral, não influencia a evolução de melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm. Sugere-se que, em investigações futuras, essa proteína seja estudada em subgrupos com e sem metástases.

O gene BRAF hiperativado pela mutação age na cascata ativando, também, MEK e ERK (DHOMEN e MARAIS 2009). Esse fato pode explicar por que, neste estudo, 95% dos casos evidenciaram atividade de MEK, e outros 67%, atividade de ERK. Dada a grande frequência de positividade

para MEK aqui observada, não foi possível investigar o seu impacto na sobrevida dos pacientes. Por sua vez, não houve diferença entre os casos positivos e negativos para ERK no que concerne à sobrevida câncer específica e à livre da doença em cinco anos.

7 CONCLUSÕES

Este estudo que visou avaliar a expressão imuno-histoquímica das proteínas da via MAPK em microarranjos de tecido (TMA) de melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm de pacientes com ou sem micrometastases em linfonodo sentinela evidenciou expressão infrequente de RAS em membrana e citoplasma. Por outro lado, expressão de MEK na grande maioria dos tumores (95% das amostras). RAF e ERK apresentaram frequência média de expressão (65 e 67% dos casos respectivamente).

Não houve associação significativa entre a expressão dessas proteínas e a sobrevida câncer-específica e livre da doença dos pacientes em cinco anos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **J Bras Patol Med Lab** 2007; 43:55-60.

Amersi F, Morton DL. The role of sentinel lymph node biopsy in the management of melanoma. **Adv Surg** 2007; 41:241-56.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **J Clin Oncol** 2009; 27:6199-206.

Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. **Dermatol Res Pract** 2010; 2010. pii: 583748.

Blokx WA, van Dijk MC, Ruiter DJ. Molecular cytogenetics of cutaneous melanocytic lesions: Diagnostic, prognostic and therapeutic aspects. **Histopathology** 2010; 56:121-32.

Cartlidge RA, Thomas GR, Cagnol S, et al. Oncogenic BRAF(V600E) inhibits BIM expression to promote melanoma cell survival. **Pigment Cell Melanoma Res** 2008; 21:534-44.

Cho YR, Chiang MP. Epidemiology, staging (new system), and prognosis of cutaneous melanoma. **Clin Plast Surg** 2010; 37:47-53.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. **J Natl Cancer Inst** 1989; 81:1893-904.

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

Costache M, Simionescu O, Sajin M, et al. Apoptosis in cutaneous melanomas. **Rom J Morphol Embryol** 2007; 48:343-7.

Crotty KA, Menzies SW. Dermoscopy and its role in diagnosing melanocytic lesions: a guide for pathologists. **Pathology** 2004; 36:470-7.

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

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

Dhomen N, Marais R. BRAF signaling and targeted therapies in melanoma. **Hematol Oncol Clin North Am** 2009; 23:529-45.

Duncan LM. The classification of cutaneous melanoma. **Hematol Oncol Clin North Am** 2009; 23:501-13.

Edlundh-Rose E, Egyházi S, Omholt K, et al. NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. **Melanoma Res** 2006; 16:471-8.

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

Friday BB, Adjei AA. Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. **Clin Cancer Res** 2008; 14:342-6.

Garbe C, Peris K, Hauschild A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. **Eur J Cancer** 2010; 46:270-83.

Garbe C, Eigentler TK, Bauer J, et al. Histopathological diagnostics of malignant melanoma in accordance with the recent AJCC classification 2009: Review of the literature and recommendations for general practice. **J Dtsch Dermatol Ges** 2011; 9:690-9.

Gershenwald JE, Ross MI. Sentinel-lymph-node biopsy for cutaneous melanoma. **N Engl J Med** 2011; 364:1738-45.

Giuliani N, Lunghi P, Morandi F, et al. Downmodulation of ERK protein kinase activity inhibits VEGF secretion by human myeloma cells and myeloma-induced angiogenesis. **Leukemia** 2004; 18:628-35.

Goydos JS, Mann B, Kim HJ, et al. Detection of B-RAF and N-RAS mutations in human melanoma. **J Am Coll Surg** 2005; 200:362-70.

Houben R, Ortmann S, Drasche A, Troppmair J, Herold MJ, Becker JC. Proliferation arrest in B-Raf mutant melanoma cell lines upon MAPK pathway activation. **J Invest Dermatol** 2009; 129:406-14.

Ibrahim N, Haluska FG. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. **Ann Rev Pathol** 2009; 4:551-79.

Inamdar GS, Madhunapantula SV, Robertson GP. Targeting the MAPK pathway in melanoma: why some approaches succeed and other fail. **Biochem Pharmacol** 2010; 80:624-37.

Ivan D, Prieto VG. Use of immunohistochemistry in the diagnosis of melanocytic lesions: applications and pitfalls. **Future Oncol** 2010; 6:1163-75.

Kannengiesser C, Spatz A, Michiels S, et al. Gene expression signature associated with BRAF mutations in human primary cutaneous melanomas. **Mol Oncol** 2008; 1:425-30.

Lages RB, Vieira SC, Abreu BAL, Rodrigues INL, Santos LG, Cordeiro NM. Sentinel lymph node biopsy in cases of skin melanoma: initial experiences at a center in Northeastern Brazil. **An Bras Dermatol** 2011; 86:379-82.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Pele: melanoma**. Disponível em: <URL:http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma>. [2012 jan 30].

Moroi Y. Significance of sentinel lymph node biopsy in malignant melanoma:overview of international data. **Int J Clin Oncol** 2009; 14:485-9.

Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, et al. Main roads to melanoma. **J Transl Med** 2009; 7:86.

Platz A, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J. Human cutaneous melanoma: a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. **Mol Oncol** 2008; 1:395-405.

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

Reed RJ. **New concepts in surgical pathology of the skin**. New York: Wiley; 1976. Acral lentiginous melanoma; p.89-90.

Riker AI, Zea N, Trinh T. The epidemiology, prevention, and detection of melanoma. **Ochsner J** 2010; 10:56-65.

Rother J, Jones D. Molecular markers of tumor progression in melanoma. **Curr Genomics** 2009; 10:231-9.

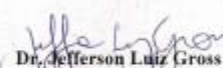
Russo AE, Torrisi E, Bevelacqua Y, et al. Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies. **Int J Oncol** 2009; 34:1481-9.

Sánchez-Yus E, Herrera M, Simón RS, Requena L. [But... Was there ever a Clark classification of melanomas?] **Actas Dermosifiliogr** 2010; 101:19-30.

Sekulic A, Haluska P Jr, Miller AJ, et al. Melanoma Study Group of Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. **Mayo Clin Proc** 2008; 83:825-46.

Smalley KS. Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. **J Invest Dermatol** 2010; 130:28-37.

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

 Hospital A.C. Camargo Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer	Comitê de Ética em Pesquisa - CEP
São Paulo, 19 de Maio de 2010.	
Ao Dr. Gilles Landman	
Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1414/10 "Estudo da expressão de proteínas da via de sinalização MAPK em melanomas primários de pacientes com ou sem micrometástases em linfonodos sentinela."	
Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 11/05/2010, <u>aprovaram</u> a realização do projeto em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:	
➤ Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos; ➤ Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde; ➤ Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido; ➤ Orçamento Financeiro Detalhado; ➤ Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica; ➤ Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Cutânea.	
Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.	
Atenciosamente,	
 Dr. Jefferson Luiz Gross 1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa	
1/1	
Fundação Antonio Prudente – CNPJ/MF N. 60.961.968/0001-06 Rua Prof. Antônio Prudente, 211 – Uberlândia – São Paulo, SP – 01509-900 Telefone: (11) 2189-5000 www.accamargo.org.br	

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto: 1414/10

Título: "Estudo da expressão de proteínas da via de sinalização MAPK em melanomas primários de pacientes com ou sem micrometástases em linfonodos sentinela."

Pesquisador Responsável: Gilles Landman

Aluna: Aline Sayuri Furuya Shiga

Patrocinador: Será submetido à FAPESP

Comentários gerais:

Projeto retrospectivo com objetivo de estudar a via de sinalização MAPK em melanomas primários de pacientes com e sem micrometástases em linfonodos sentinela.

Adequação do título: Adequado

Adequação da revisão de literatura: Adequada

Adequação dos objetivos frente à literatura: Adequada

Desenho e metodologia do projeto (grupos experimentais, procedimentos, indicadores de resultado, tipo de estudo, fase da pesquisa):

Estudo retrospectivo no qual serão coletadas amostras dos arquivos do departamento de Anatomia Patológica no período de 1997 a 2009.

Serão revistos os preparados histológicos de melanomas para confirmação diagnóstica e estabelecimento dos parâmetros prognósticos conforme estabelecido pelo Grupo Brasileiro de Melanoma e Sociedade Brasileira de Patologia.

Será realizado também levantamento dos prontuários para obtenção dos dados demográficos, histológicos relativos à evolução da doença. Os dados serão imputados em ficha específica.

Critérios de participação:

- Presença de apenas um melanoma primário;
- Ausência de patologia prévia predisponente, como xeroderma pigmentoso;
- Pacientes cujos blocos de parafina estiverem disponíveis e em quantidade suficiente para confecção do TMA. Para tal, melanomas com espessura maior que 1,0 mm serão incluídos no estudo.

Riscos e benefícios aos sujeitos: Não há riscos aos sujeitos de pesquisa, por se tratar de projeto retrospectivo.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Solicitada a dispensa por se tratar de pesquisa retrospectiva.

Análise crítica de riscos: Não há riscos

Duração total da pesquisa: 24 meses

Explicitação das responsabilidades:

- do pesquisador: N/A
- do patrocinador: N/A

Explicitação dos critérios para suspender ou encerrar a pesquisa: N/A

Local de pesquisa:

- Departamento de Anatomia Patológica;
- Departamento de Oncologia Cutânea.

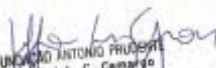
Orçamento: Será solicitado auxílio FAPESP para custear as despesas do projeto.

Análise da Comissão de Pesquisa: Aprovado

Comentários Finais:

Proposta adequada com objetivos, metodologia e orçamento claros.
Cronograma adequado e revisão de literatura atual, consistente e sem equívocos conceituais identificados.

Parecer Final: Aprovado


FÚLVIO ANTONIO PRUDENTE
Mestrado A. C. Camargo
Coordenador do Curso em Pós-graduação
Dr. Jefferson Luiz Groves
1º Vice-Coordenador

Anexo 2 - Dados clínico-demográficos de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1 mm.

Casos	Iniciais	Gênero	Idade	Antecedentes pessoais	Antecedentes familiares
1	LB	Masc	65	NI	NI
2	GZC	Fem	59	NI	NI
3	ITLS	Fem	61	NI	NI
4	JSC	Masc	59	NI	NI
5	AZG	Fem	63	Não	NI
6	ACZ	Fem	47	Não	Não
7	OCLG	Masc	99	NI	NI
8	PBFP	Masc	47	NI	NI
9	AFS	Fem	85	NI	NI
10	EB	Masc	85	NI	NI
11	JMZ	Masc	47	Não	Sim
12	RCS	Fem	27	NI	NI
13	KP	Fem	27	NI	NI
14	JTT	Masc	61	NI	NI
15	JNS	Fem	21	Não	Não
16	MPF	Fem	66	NI	NI
17	JTU	Fem	51	Não	Não
18	JF	Masc	24	Não	Não
19	MASF	Masc	44	NI	NI
20	PAS	Masc	69	NI	NI
21	SPA	Masc	68	Não	Não
22	VSS	Fem	43	Não	Não
23	BBB	Fem	71	Não	Não
24	LLF	Masc	38	Não	Não
25	LCB	Masc	57	Não	Não
26	ABS	Fem	64	Não	Não
27	GFJS	Masc	73	Não	Não
28	ACF	Masc	31	Não	Não
29	JRN	Masc	49	NI	NI
30	NS	Masc	54	Não	Não
31	AM	Masc	81	NI	NI
32	CMC	Fem	70	NI	NI
33	APN	Masc	53	Não	Não
34	CAAP	Masc	52	Não	Não
35	NRC	Masc	54	NI	NI
36	LLZA	Fem	37	Não	Não
37	MSTV	Masc	51	NI	NI
38	NMZ	Fem	65	NI	NI
39	MFGG	Fem	48	Não	Não
40	AF	Masc	58	Não	Não
41	LCFB	Masc	48	NI	NI
42	GMS	Masc	43	NI	NI
43	SRS	Fem	53	NI	NI
44	ONSF	Fem	58	NI	NI
45	KY	Masc	66	Não	Não
46	AB	Masc	83	Não	Não
47	CJ	Fem	80	Não	Não
48	DLM	Masc	56	NI	NI
49	MAK	Fem	67	NI	NI
50	CEF	Masc	53	NI	NI
51	SSM	Masc	59	Não	Não
52	SMM	Fem	43	Não	Não
53	JLMV	Fem	43	Não	Não
54	GCG	Masc	71	Não	Não
55	JFPO	Fem	25	Não	Não
56	VRSC	Fem	42	Não	Não
57	JIC	Masc	32	Não	Não
58	CMMS	Fem	45	NI	NI
59	SAA	Masc	67	Sim	Sim
60	DHM	Fem	67	NI	NI
61	LBG	Masc	69	NI	NI
62	ALC	Fem	78	NI	NI
63	CHB	Fem	99	NI	NI

Anexo 3 - Dados histológicos de tecido tumoral de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1mm (parte 1).

Casos	Local	Tipo histológico	Espessura	Crescimento	Clark	Mitoses (/10CGA)
1	Tronco	Nodular	4,30	Vertical	III	21
2	Membros inferiores	Nodular	3,20	Vertical	III	7
3	NI	Superficial	1,70	Vertical	III	9
4	Tronco	Nodular	3,80	Vertical	IV	4
5	Membros inferiores	Nodular	3,40	Vertical	IV	4
6	Membros inferiores	Superficial	2,40	Vertical	IV	4
7	NI	NI	1,00	NI	NI	NI
8	Tronco	Superficial	1,60	Vertical	III	3
9	Planta do pé	Acral	14,00	Vertical	V	11
10	Planta do pé	Superficial	1,00	Vertical	III	NI
11	Membros inferiores	Superficial	1,20	radial	III	1
12	Tronco	Superficial	1,40	Vertical	III	1
13	Membros inferiores	Superficial	1,10	Vertical	III	3
14	Planta do pé	Acral	1,40	Vertical	III	7
15	Membros inferiores	NI	1,00	NI	NI	0
16	Membros inferiores	Superficial	1,00	Vertical	II	1
17	Membros superiores	Superficial	1,10	Vertical	III	5
18	Pescoço	Superficial	1,85	Vertical	III	1
19	NI	Superficial	1,00	NR	NI	NI
20	Planta do pé	Acral	2,10	Vertical	IV	NI
21	Membros superiores	Superficial	2,50	Vertical	IV	3
22	NI	Superficial	1,00	NI	III	NI
23	Cabeça	Nodular	5,20	Vertical	IV	6
24	Membros inferiores	Nodular	3,80	Vertical	V	6
25	Membros inferiores	Outros	6,50	Vertical	IV	5
26	Membros inferiores	Superficial	2,75	Vertical	IV	18
27	Tronco	Outros	6,20	Vertical	IV	6
28	Cabeça	Superficial	2,20	Vertical	IV	2
29	Tronco	Superficial	2,30	Vertical	III	3
30	Tronco	Superficial	6,50	Vertical	IV	0
31	Planta do pé	Superficial	3,55	Vertical	IV	5
32	Membros inferiores	Nodular	8,50	NI	V	1
33	Tronco	Superficial	7,50	Vertical	IV	8
34	Planta do pé	Acral	2,80	Vertical	IV	4
35	Tronco	NI	1,60	Vertical	III	1
36	Membros superiores	Superficial	1,00	Vertical	III	0
37	Tronco	Superficial	1,00	radial	II	0
38	Membros inferiores	Superficial	1,10	Vertical	III	0
39	Membros inferiores	Nodular	3,00	Vertical	III	2
40	Membros superiores	Nodular	6,80	Vertical	V	19
41	Cabeça	Superficial	2,20	Vertical	IV	3
42	Cabeça	Superficial	1,50	Vertical	III	13
43	Membros superiores	Superficial	1,50	Vertical	IV	1
44	Cabeça	Superficial	9,70	Vertical	V	6
45	Membros inferiores	Acral	5,70	Vertical	III	1
46	Membros superiores	Nodular	4,30	Vertical	IV	6
47	Tronco	Superficial	2,60	Vertical	III	11
48	Tronco	Superficial	1,00	Vertical	III	1
49	Tronco	Superficial	2,20	Vertical	IV	3
50	Tronco	Superficial	1,00	Vertical	III	3
51	Membros inferiores	Superficial	1,15	Vertical	III	5
52	Membros superiores	Superficial	2,30	Vertical	III	15
53	Membros superiores	Acral	3,80	Vertical	NI	0
54	Outras	Acral	4,20	Vertical	NI	8
55	Tronco	Superficial	1,20	Vertical	III	7
56	Membros superiores	Superficial	3,00	Vertical	III	10
57	Tronco	Nodular	5,60	Vertical	NI	9
58	Membros inferiores	Superficial	1,50	Vertical	III	2
59	Membros inferiores	Superficial	3,60	Vertical	IV	2
60	Tronco	Superficial	1,30	Vertical	III	0
61	Membros superiores	Superficial	1,30	Vertical	III	1
62	Planta do pé	Acral	2,35	Vertical	IV	3
63	NI	Superficial	1,00	Vertical	III	4

Anexo 4 - Dados histológicos de tecido tumoral de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1mm (parte 2).

Casos	Ulceração	Regressão	Invasão sanguínea	Invasão linfática	Satelitoses
1	Sim	Não	Não	Não	Não
2	Não	Não	Não	Não	Não
3	Não	Não	Não	Não	Não
4	Sim	Não	Não	Não	Não
5	Não	Não	Não	Não	Não
6	Não	Não	Não	Não	Não
7	NI	NI	NI	NI	NI
8	Não	Não	Não	Não	Não
9	Sim	Não	Não	Sim	Sim
10	Não	Não	Não	Não	Não
11	Sim	Não	Não	Não	Não
12	Não	Não	Não	Não	Não
13	Não	Não	Não	Não	Não
14	Sim	Não	Não	Não	Não
15	NI	Não	Não	Não	Não
16	Não	Não	Não	Não	Não
17	Não	Não	Não	Não	Não
18	Não	Não	Não	Não	Não
19	Não	Não	Não	Não	Não
20	Não	Não	Não	Não	Não
21	Não	Não	Não	Não	Não
22	NI	NI	NI	NI	NI
23	Sim	Não	Não	Não	Não
24	NI	Não	Não	Não	Não
25	Sim	Não	Não	Não	Sim
26	Sim	Não	Não	Sim	Não
27	NI	Não	Não	Não	Não
28	Não	Não	Não	Não	Não
29	Não	Não	Não	Não	Não
30	Não	Não	Não	Não	Não
31	Não	Não	Não	Não	Não
32	NI	Não	Não	Não	Não
33	Sim	Não	Não	Sim	Não
34	Não	Não	Não	Não	Não
35	Não	Não	Não	Não	Não
36	Não	Não	Não	Não	Não
37	Não	Não	Não	Não	Não
38	NI	Não	Não	Não	Não
39	Sim	Não	Não	Não	Não
40	Sim	Não	Não	Não	Não
41	Não	Não	Não	Não	Não
42	Não	Não	Não	Não	Não
43	Não	Não	Não	Não	Não
44	Não	Não	Não	Sim	Não
45	Não	Não	Não	Não	Não
46	Sim	Não	Não	Não	Não
47	Sim	Não	Não	Não	Não
48	Sim	Não	Não	Não	Não
49	Não	Não	Não	Não	Não
50	Não	Não	Não	Não	Não
51	Não	Não	Não	Não	Não
52	Não	Não	Não	Não	Não
53	NI	Não	Não	Não	Não
54	Sim	Não	Não	Não	Não
55	Sim	Não	Não	Não	Não
56	Não	Não	Não	Não	Não
57	Sim	Não	Não	Não	Não
58	Não	Não	Não	Não	Não
59	Não	Não	Não	Sim	Não
60	Não	Não	Não	Não	Não
61	Não	Não	Não	Não	Não
62	Não	Não	Não	Não	Não
63	Não	Não	Não	Não	Não

Anexo 5 - Dados de disseminação tumoral de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1mm.

Casos	Localização do linfonodo sentinela	Linfadenectomia	Linfonodos retirados	Linfonodos positivos
1	-	Sim	47	8
2	Inguinal E	Sim	15	5
3	-	Sim	11	3
4	-	Sim	55	9
5	Inguinal E	Sim	10	5
6	Inguinal D	Sim	8	0
7	NI	NI	NI	NI
8	Axilar E	Não	-	-
9	-	Sim	10	4
10	Inguinal E	Não	0	0
11	Inguinal D	Sim	19	0
12	Inguinal D	Sim	13	0
13	Axilar E	Não	0	0
14	Inguinal D	Sim	11	0
15	NI	Sim	29	4
16	Inguinal D	Não	-	-
17	Axilar D	Não	-	-
18	Axilar E	Não	0	0
19	-	Sim	24	7
20	-	Sim	4	1
21	Axilar D	Não	-	-
22	Inguinal D	Não	0	0
23	-	Não	0	0
24	Inguinal E	Não	-	-
25	-	Sim	NI	NI
26	-	Sim	34	5
27	Axilar E	Não	0	0
28	Cervical D	Sim	32	0
29	Axilar D	Não	-	-
30	-	Sim	74	1
31	Inguinal D	Não	-	-
32	Inguinal D	Sim	12	3
33	Inguinal D	Sim	11	0
34	Inguinal D	Não	-	-
35	Axilar D	Não	-	-
36	Axilar E	Não	0	0
37	Axilar E	Sim	49	0
38	Inguinal D	Não	-	-
39	Inguinal E	Sim	11	0
40	Axilar D	Sim	40	0
41	-	Sim	51	6
42	Axilar D	Não	-	-
43	Axilar E	Não	-	-
44	Cervical D	Sim	6	1
45	Inguinal D	Não	-	-
46	Axilar D	Sim	52	0
47	Axilar E	Não	0	0
48	Cervical D	Não	0	0
49	Axilar D	Não	-	-
50	Axilar D	Sim	22	1
51	Axilar D	Não	-	-
52	Axilar D	Não	-	-
53	Axilar D	NI	NI	NI
54	Axilar E	Sim	24	6
55	Inguinal E	Sim	10	0
56	Axilar D	Sim	25	0
57	Axilar E	Sim	12	0
58	Inguinal E	Sim	9	0
59	NI	NI	NI	NI
60	Axilar E	Não	0	0
61	Axilar D	Sim	31	0
62	Inguinal E	Sim	8	1
63	NI	NI	NI	NI

Anexo 6 - Dados da evolução de 63 pacientes com melanomas primários com espessura igual ou maior que 1mm.

Casos	Recidivas	Tempo (meses)	Local da recidiva	Seguimento (meses)	Evolução
1	Sim	13	Pele	15	Sobrevida sem doença
2	Sim	18	Pele	20	Sobrevida com doença
3	Sim	43	Pele	110	Sobrevida sem doença
4	Sim	1	Pele + SNC + Fígado + Ossos + Outros	5	Óbito pelo melanoma
5	Sim	21	Pele + Outros	24	Óbito pelo melanoma
6	Não	0		83	Sobrevida sem doença
7	NI	NI		NI	NI
8	Não	0		21	Sobrevida sem doença
9	Sim	NI	Pele	6	Sobrevida com doença
10	Não	0		51	Sobrevida sem doença
11	Não	0		80	Sobrevida sem doença
12	NI	NI		60	Sobrevida sem doença
13	Não	0		71	Sobrevida sem doença
14	Não	0		84	Sobrevida sem doença
15	NI	NI		2	Sobrevida com doença
16	Não	0		81	Sobrevida sem doença
17	Não	0		81	Sobrevida sem doença
18	Não	0		60	Sobrevida sem doença
19	Sim	NI	Pele + SNC + Fígado	27	Sobrevida com doença
20	Sim	NI		81	Sobrevida com doença
21	Não	0		81	Sobrevida sem doença
22	Não	0		81	Sobrevida sem doença
23	Sim	11	SNC + Outros	47	Óbito pelo melanoma
24	Sim	23	Pele	33	Sobrevida sem doença
25	Sim	NI	Outros	2	Óbito pelo melanoma
26	Sim	16	Pele + Outros	15	Sobrevida com doença
27	Não	0		75	Sobrevida sem doença
28	Não	0		60	Sobrevida com doença
29	Não	0		84	Sobrevida sem doença
30	Sim	10	Pele + Outros	25	Sobrevida com doença
31	Não	0		65	Sobrevida sem doença
32	Sim	NI	Pele + Outros	60	NI
33	Sim	5	Pele + Outros	60	NI
34	Não	0		71	Sobrevida sem doença
35	Não	0		60	Sobrevida com doença
36	Não	0		44	Sobrevida sem doença
37	Não	0		60	Sobrevida sem doença
38	Não	0		59	Sobrevida sem doença
39	Não	0		72	Sobrevida sem doença
40	Não	0		11	Sobrevida sem doença
41	Sim	10	Pele + Fígado	13	Sobrevida com doença
42	Sim	42	Pele	62	Sobrevida com doença
43	Não	0		64	Sobrevida sem doença
44	Sim	NI	Pele + Ossos	48	Óbito pelo melanoma
45	Não	0		58	Sobrevida sem doença
46	Não	0		19	Sobrevida sem doença
47	Sim	NI		64	Sobrevida com doença
48	Não	0		57	Sobrevida sem doença
49	Sim	34	SNC + Outros	36	Óbito pelo melanoma
50	Sim	15	Outros	28	Sobrevida com doença
51	Não	0		36	Sobrevida sem doença
52	Não	0		1	Sobrevida com doença
53	Não	0		1	Sobrevida sem doença
54	Não	0		58	Sobrevida sem doença
55	Sim	27	Outros	57	Sobrevida sem doença
56	Não	0		53	Sobrevida sem doença
57	Não	0		42	Sobrevida sem doença
58	Não	0		48	Sobrevida com doença
59	NI	NI		NI	NI
60	Sim	30	Outros	53	Sobrevida sem doença
61	Não	0		45	Sobrevida sem doença
62	Não	0		9	NI
63	NI	NI		NI	NI

Anexo 7 - Dados do estudo das proteínas da via MAPK (intensidade + porcentagem de expressão) em melanomas com espessura igual ou maior que 1 mm.

Casos	RAS		RAF Núcleo	MEK Citoplasma	ERK Citoplasma
	Membrana	Citoplasma			
1	0	0	0	4	0
2	0	0	0	5	0
3	0	0	0	Perda	Perda
4	Perda	Perda	Perda	6	0
5	0	0	0	6	3
6	0	0	1	6	4
7	0	0	0	7	0
8	0	0	0	7	5
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	7	5
11	Perda	Perda	Perda	Perda	Perda
12	Perda	Perda	Perda	Perda	Perda
13	0	0	0	Perda	Perda
14	0	0	7	4	5
15	0	0	6	6	0
16	0	0	7	6	4
17	0	0	7	6	6
18	0	0	7	6	6
19	0	0	7	6	3
20	0	0	0	6	4
21	Perda	Perda	Perda	Perda	Perda
22	0	0	7	7	0
23	0	0	0	Perda	0
24	0	0	7	5	5
25	0	0	Perda	Perda	0
26	0	0	5	Perda	Perda
27	0	0	0	0	0
28	0	0	7	6	6
29	0	0	6	6	0
30	7	7	7	7	7
31	0	2	7	5	4
32	Perda	Perda	Perda	Perda	6
33	2	0	7	7	Perda
34	Perda	Perda	Perda	Perda	Perda
35	Perda	Perda	Perda	Perda	6
36	0	0	7	6	2
37	0	0	0	4	7
38	0	4	7	4	5
39	0	0	7	6	6
40	0	0	0	Perda	Perda
41	0	0	7	6	4
42	0	0	Perda	Perda	0
43	6	6	6	Perda	Perda
44	0	6	6	6	5
45	0	3	0	5	4
46	0	0	7	7	6
47	0	5	7	7	7
48	0	0	7	6	6
49	0	0	7	7	6
50	Perda	Perda	Perda	Perda	Perda
51	0	0	7	6	5
52	Perda	Perda	0	5	7
53	0	0	7	6	5
54	0	0	5	6	0
55	Perda	Perda	Perda	Perda	Perda
56	0	0	7	7	7
57	0	0	7	Perda	5
58	0	0	0	5	0
59	0	0	4	Perda	0
60	Perda	Perda	Perda	2	Perda
61	0	3	6	6	4
62	0	0	Perda	Perda	0
63	0	0	Perda	Perda	Perda