

CORRELAÇÃO ENTRE O PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES E A EVOLUÇÃO CLÍNICA EM MELANOMAS CUTÂNEOS

OTÁVIO MACHADO DE ALMEIDA

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rogério Izar Neves

**São Paulo
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Almeida, Otávio Machado

**Correlação entre o perfil de expressão de genes e a evolução
clínica em melanomas cutâneos** / Otávio Machado de Almeida -- São
Paulo, 2007.

84p.

Tese(doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Rogério Izar Neves

Descritores: 1. MELANOMA. 2. PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA.
3. GENES DO CÂNCER. 4. ANÁLISES MICROARRAY.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Gilberto** e **Elenice** (in memorian), meus exemplos de vida..

Aos meus irmãos, **Gilberto** (in memorian), **Renato** e **Eduardo**, grandes amigos.

Aos meus maravilhosos filhos, **Marina** e **Caio**, motivo de grande orgulho e que souberam entender com paciência os momentos que não pude brincar com eles.

À minha amada esposa **Cecília**, que novamente me incentivou e soube me compreender nos momentos mais delicados deste trabalho. A minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Rogério Izar Neves**, meu orientador e colaborador. Amigo de longa data, sempre soube me incentivar visando meu crescimento dentro da profissão, tornando-se assim um exemplo a ser seguido.

Ao Prof. **Dr. Rolf Gemperli**, Professor Associado da Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, não só pela amizade como também pelos ensinamentos e grande orientação à minha carreira profissional.

À farmacêutica **Waleska Keller Martins**, responsável pela parte experimental deste trabalho e cujo companheirismo e colaboração, tornou possível a realização do mesmo.

A todos colegas do Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital do Câncer, grandes amigos e incentivadores.

A todos os colegas da Clínica Nomina, pela grande ajuda fornecida nos momentos de minha ausência.

Ao **Dr. Luiz Fernando Reis**, pela orientação sempre tranquilizadora nos momentos mais difíceis da elaboração deste trabalho.

Às funcionárias da Biblioteca do Hospital A. C. Camargo, pela amabilidade e senso profissional demonstrado em todos estes anos de pesquisa e na elaboração da tese.

Ao Sr. **Gustavo Esteves** do Instituto de Matemática e Estatística da USP pela inestimável colaboração na análise dos dados relacionados ao perfil de expressão de genes.

A Sra. **Ana Paula Scramin** pelo auxílio nas análises estatísticas.

RESUMO

Almeida OM. **Correlação entre o perfil de expressão de genes e a evolução clínica em melanomas cutâneos**. São Paulo; 2007. (Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente)

O melanoma cutâneo representa um tipo de câncer de pele pouco freqüente, porém um dos mais agressivos. Com incidência crescente em todo o mundo, quando diagnosticado precocemente apresenta elevados índices de cura, mas a presença de metástase linfonodal ou visceral à distância reduz estes níveis de maneira significativa, implicando em taxas de sobrevida de 20 a 40% em 5 anos. Vários fatores histológicos e clínicos já foram identificados como prognósticos no melanoma cutâneo, no entanto em muitas situações, pacientes com características clínicas semelhantes e tumores semelhantes, evoluem de maneira diferente. É possível que fatores moleculares estejam envolvidos nesta evolução inesperada. Com o objetivo de tentar identificar possíveis genes relacionados com a biologia do tumor, construímos um banco de dados com 63 pacientes atendidos no Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital do Câncer – A. C. Camargo onde foram identificados os fatores clínicos, histológicos e a evolução clínica destes pacientes. Extraíndo-se o RNA dos tumores destes pacientes (23 lesões primárias e 40 metastáticas), conseguiu-se por cDNA microarray identificar um perfil de expressão de genes para cada paciente. Esse perfil de genes foi comparado entre os pacientes após dividi-los em grupos levando-se em consideração o prognóstico de cada um e sua evolução, se era a esperada ou não para suas características clínicas e histológicas. Nesta comparação encontramos como genes diferencialmente expressos de maneira significativa AP3B2 (adapter related protein complex 3, Beta 2 subunit) e o UGCGL2 (UDP glucose ceramide, glycosyltransferase like 2). Foi realizada também a comparação de expressão gênica entre os pacientes dividindo-os de acordo com algumas variáveis como sexo, localização do tumor, subtipo histológico,

presença de regressão, presença de ulceração, Breslow e índice mitótico. Individualizando-se a variável sexo, o gene JARID1D (AT rich interactive domain 1 D, RBP2 like) apresentou-se mais expresso no sexo feminino numa proporção estatisticamente significativa. Individualizando-se a variável tipo histológico, o gene COL 16 A1 (collagen type XVI alpha 1) apresentou-se diferencialmente expresso. No estudo das outras variáveis não foi encontrado nenhum gene diferencialmente expresso de maneira significativa. Apesar de não encontrarmos grande correlação entre o perfil de expressão de genes e a evolução clínica de pacientes com melanoma cutâneo, nosso estudo pode estabelecer um banco de dados que poderá colaborar em projetos futuros.

SUMMARY

Almeida OM. **[Gene expression profiling of cutaneous melanoma related to clinical outcome]**. São Paulo; 2007. (Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente).

Cutaneous melanoma is the an uncommon skin cancer but is one of the most aggressive. Although prognosis for early local melanoma is favorable, distant metastasis represent 5-year overall survival between 20 and 40%. Many clinical and histological factors are known to be related to cutaneous melanoma prognostic, but sometimes similar patients with similar tumors have different clinical evolution. We believe that molecular factors must be involved in this unexpected outcome. Aiming to identify possible genes related to cutaneous melanoma biology we made a data bank with 63 patients attended in the Skin Oncology Department of the Hospital do Câncer de São Paulo – A. C. Camargo, taking in account clinical and histological factors. Also, tissue sample from the tumors were extracted from each patient (23 primary and 40 metastatic lesions) to isolate RNA. Utilizing cDNA **microarray** technology, gene profile from each patient was achieved. This gene profile was compared between groups of patients defined by the prognosis expected and the evolution that occurred, if it was expected or unexpected. Two genes differentially expressed, AP3B2 (adapter related protein complex 3, Beta 2 subunit) and UGCGL2 (UDP glucose ceramide, glycosyltransferase like 2) were found after comparing the groups. The gene profile was compared also dividing the patients in some prognostic factors as sex, primary tumor site, histological subtype, regression, ulceration, Breslow index and mitotic rate. Analyzing the factor sex alone, JARID1D gene (AT rich interactive domain 1 D, RBP2 like) presented overexpressed in the female sex. Analyzing the melanoma histological subtype, COL 16 A1 gene (collagen type XVI alpha 1) presented differentially expressed. Analyzing the other factors, no other genes were found differentially expressed. In our

study we built a melanoma data bank with clinical, histological and molecular informations. All this data will be very helpful for future studies about melanoma clinical outcome and melanoma gene profile. As conclusion we can say we identified some genes that can be related to cutaneous melanoma biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo de progressão tumoral em melanoma.	9
Figura 2	Esquema da metodologia utilizada para a obtenção do perfil de genes através de <i>cDNA microarray</i> .	33
Figura 3	Classificação dos pacientes de acordo com a faixa etária à época do diagnóstico.	39
Figura 4	Classificação dos pacientes de acordo com o tipo histológico do tumor primário.	40
Figura 5	Classificação dos pacientes de acordo com a localização do tumor primário.	41
Figura 6	Relação entre o índice de Breslow e o status de sobrevida da população estudada.	46
Figura 7	Relação entre a ulceração e o status de sobrevida da população estudada.	47
Figura 8	Tempo livre de doença em meses na população estudada.	47
Figura 9	Tempo de sobrevida global em meses na população estudada.	48

LISTA DE QUADRO TABELAS

Quadro 1	Estadiamento do melanoma cutâneo segundo a AJCC – 2001	6
Tabela 1	Características clínicas e histopatológicas da população estudada.	43
Tabela 2	Classificação dos pacientes em grupos levando em consideração seu prognóstico esperado e a evolução apresentada.	48
Tabela 3	Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão entre má e boa evolução fixando bom prognóstico.	50
Tabela 4	Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão entre mau e bom prognóstico fixando boa evolução	51
Tabela 5	Análise da expressão de genes após interação entre os dados obtidos fixando-se bom prognóstico e boa evolução.	52
Tabela 6	Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão no sexo feminino e masculino.	54
Tabela 7	Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão de acordo com o tipo histológico.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ng	Nanograma
A. C. Camargo	Antonio Candido Camargo
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ANOVA	Analysis of variance
AP3B2	adapter related protein complex 3, Beta 2 subunit
BSA	Albumina bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
COL 16 A1	collagen type XVI alpha 1
DEPC	Di etil piro carbonato
DHL	Desidrogenase láctica
EDTA	Ácido etil diamino tetra acético
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDR	False Discovery Rate
g	gravidade
g1/S	Gap 1 / Synthesis (etapas do ciclo celular)
HCl	Ácido clorídrico
ILPC/SP	Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer de São Paulo
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JARID1D	AT rich interactive domain 1 D, RBP2 like
M	Metástase
milliQ	milicurie
mm	milimetro
mol/L	Mols por litro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
N	Nódulo
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
nm	Namômetro

oC	Graus Celsius
ORESTES	Open reading frame est sequences
PCR	Polimerase chain reaction
pTNM	Tumor, nódulo, metástase
RPM	Rotações por minuto
SAGE	Serial analysis of gene expression
SDS	Sulfato de sódio dodecil
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (software de estatística)
TCSC	Tecido celular subcutâneo
TIFF	Tagged Information File Format
UGCG2	UDP glucose ceramide, glicosyltransferase like 2
µg	Microgramas

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	População de pacientes	21
3.2	Extração do RNA	22
3.3	Validação Histopatológica das Amostras	23
3.4	Extração do RNA Total	23
3.5	Amplificação do RNA Mensageiro e Referência	24
3.6	Construção da Lâmina de cDNA Microarray	27
3.7	Marcação Indireta	28
3.8	Hibridização	30
3.9	Digitalização das Imagens	31
3.10	Seguimento Clínico	34
3.11	Análise Estatística	37
4	RESULTADOS	39
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÕES	72
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

ANEXOS

Anexo 1 Relação entre o índice de Breslow e o status de sobrevida na população estudada. $P= 0,023$

Anexo 2 Relação entre a presença de ulceração e o status de

sobrevida na população estudada. $P = 0,233$

- Anexo 3** Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão no grupo de pacientes abaixo de 60 anos de idade e acima de 60 anos de idade (apenas alguns genes com pvalor mais próximo de 0,05).
- Anexo 4** Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão de acordo com a localização do tumor primário (apenas alguns genes com pvalor mais próximo de 0,05).
- Anexo 5** Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão de acordo com o índice mitótico (apenas alguns genes com pvalor mais próximo de 0,05).
- Anexo 6** Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão de acordo com a presença ou não de regressão histológica (apenas alguns genes com pvalor mais próximo de 0,05).
- Anexo 7** Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão de acordo com a presença ou não de ulceração (apenas alguns genes com pvalor mais próximo de 0,05).
- Anexo 8** Termo de informação e consentimento.
- Anexo 9** Protocolo utilizado para a coleta de dados e seguimento dos pacientes.

1 INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo (MC) é uma doença maligna originada dos melanócitos, célula que se encontra na camada basal da epiderme e que é responsável pela coloração da pele. É um câncer de pele pouco freqüente, porém um dos mais agressivos, com elevados índices de mortalidade e aumento na incidência mundial em torno de 6% ao ano. Estatísticas americanas descrevem aproximadamente 53600 novos casos de MC por ano, responsáveis por aproximadamente 8.000 mortes, número este que corresponde a 2% de todas as mortes por câncer naquele país. Acredita-se que atualmente 1 em cada 74 pessoas nascidas nos EUA irá desenvolver MC em algum período da sua vida (STADELMANN et al. 1998). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer-INCA, estão previstos para o ano de 2006, 2710 casos novos em homens e 3050 em mulheres, com aproximadamente 1350 óbitos (Ministério da Saúde 2005).

Indivíduos de pele clara com tendência a queimaduras solares, cabelos loiros ou ruivos e olhos azul ou cinza apresentam maior chance de desenvolver MC. A presença de elevado número de lesões pigmentadas e nevos congênitos também contribuem para uma maior incidência de MC (BARNHILL e MIHM 1998; CHUDNOVSKY et al. 2005).

Fatores genéticos também estão relacionados com o aparecimento do melanoma. Cerca de 10% dos pacientes com MC têm história familiar (ALBINO et al. 1993; FOUNTAIN 1998). O melanoma familiar parece se dever a presença de vários genes de suscetibilidade de alta penetrância atuando isoladamente ou em associação com vários genes de menor penetrância. Entre os genes de suscetibilidade de alta penetrância, CDKN2A e CDK4 são os mais identificados e o gene MC1R tem sido associado com maior risco de melanoma tanto em população normal como em famílias com mutação de CDKN2A (PIEPKORN 2000; GIBBS et al. 2002).

O diagnóstico do MC é feito pelo exame anatomopatológico das lesões suspeitas e a importância da precocidade deste diagnóstico caracteriza-se por proporcionar maiores taxas de sobrevida. A suspeita de atipia de uma lesão pigmentada é feita por suas características macroscópicas como assimetria, bordas irregulares, coloração variada, diâmetro maior do que 6 mm e crescimento recente ou então por características dermatoscópicas (LANGLEY et al. 1998). A dermatoscopia representa o mais recente avanço para o diagnóstico precoce auxiliando na escolha das lesões que devem ser biopsiadas (ZALAUDEK et al. 2003).

De acordo com seu padrão de crescimento, o MC pode ser classificado em extensivo superficial, nodular, acral lentiginoso e lentigo maligno, cada tipo apresentando características clínicas e prognósticos diferentes. O melanoma extensivo superficial é a modalidade mais comum, encontrada em aproximadamente 70% dos casos e geralmente originário de lesão névica pré-

existente; o melanoma nodular compreende de 15 a 30% dos casos e é mais agressivo clinicamente; o melanoma acral lentiginoso é comum nas plantas dos pés, mas pode atingir também as palmas das mãos e leitos ungueais, representando de 2 a 8% dos melanomas na raça branca e 50% dos casos nos negros e asiáticos; o lentigo maligno melanoma corresponde de 4 a 10% dos casos de melanoma, apresentando crescimento muito lento e com pouca propensão para disseminação sistêmica (LANGLEY et al. 1998).

Melanomas com padrão de crescimento vertical têm maior potencial de metástases do que aqueles com crescimento radial, pois existe uma proliferação maior de células atípicas na derme que podem atingir a circulação linfática e sanguínea (SLOMINSKI et al. 2001).

O estadiamento clínico do MC é feito segundo o sistema da American Joint Committee on Cancer (AJCC) baseado na classificação pTNM e revisto recentemente (BALCH et al. 2001a e b). Após o trabalho de BALCH et al. (2001b), a AJCC aprovou a nova versão do estadiamento do melanoma baseando-se numa análise de fatores prognósticos que envolveram 17600 pacientes com melanoma em 13 centros espalhados pelo mundo. Os dados foram obtidos em estudos prospectivos de pacientes que não receberam nenhum tipo de tratamento adjuvante e que apresentavam dados completos em relação aos dados clínicos, patológicos e cirúrgicos. Os vários fatores estudados foram então comparados e os resultados levaram ao estadiamento atual.

Nesse estudo anterior, a espessura tumoral (índice de Breslow), que representa a medida em milímetros da profundidade atingida pelo tumor a partir da camada granulosa da epiderme, se comportou como o fator prognóstico mais importante nos melanomas localizados por apresentar estreita correlação com sobrevida. A estratificação da espessura tumoral foi alterada para 4 categorias denominadas de T1 a T4:

T1: $\leq 1.0\text{mm}$;

T2: 1.01 – 2.00 mm;

T3: 2.01 – 4.00 mm;

T4: $> 4.00\text{ mm}$.

A presença ou ausência de ulceração microscópica foi considerada como o segundo fator independente mais importante no prognóstico do melanoma. Pacientes com tumores primários ulcerados apresentam o dobro de risco para o desenvolvimento de metástases à distância. A presença de ulceração reduziu a taxa de sobrevivência em todas estas categorias descritas e portanto justificou sua inclusão como o segundo determinante para a classificação do T. Foi verificado também que a ulceração correspondia ao único fator do tumor primário que modificava o prognóstico dos pacientes com presença de linfonodos positivos.

O nível de invasão segundo Clark, que se baseia na localização anatômica do envolvimento do tumor (I – in situ; II – invasão da derme papilar; III – invasão da derme reticular superficial; IV – invasão da derme reticular profunda; V – invasão do tecido celular subcutâneo) é inversamente

proporcional ao índice de sobrevida, mas uma correlação deste tipo consistente só foi observada em tumores de espessura fina, ou seja, naqueles com Breslow menor do que 1mm (estádio I). Em tumores maiores do que 1 mm, o nível de Clark não apresenta impacto na sobrevida.

O primeiro fator adotado nesse novo estadiamento para a definição da categoria N foi o número de linfonodos comprometidos, que se mostrou fortemente associado ao índice de sobrevida em 10 anos. Desta maneira, pacientes com apenas um linfonodo metastático foram categorizados, como N1, com dois ou três linfonodos como N2 e aqueles com quatro ou mais linfonodos, como N3. O segundo fator prognóstico para pacientes com metástases linfonodais a ser considerado é o tipo de metástase, que pode ser micro ou macrometástase e que apresentam taxas de sobrevida diferentes. O terceiro critério utilizado para definir a categoria N é a presença ou ausência de satelitose ou metástase em trânsito, independente do número de lesões. A presença destas lesões implica em taxas menores de sobrevida.

Nos pacientes com metástases à distância, o sítio da metástase e o nível elevado da enzima desidrogenase láctica (DHL) foram utilizados para dividir o M. Pacientes com metástases cutâneas, subcutâneas ou linfonodais à distância (M1a) apresentam melhor prognóstico do que aqueles pacientes com metástases em pulmão (M1b), que por sua vez apresentam melhor prognóstico do que pacientes com outras metástases viscerais (M1c). Na presença de DHL sérica elevada, o prognóstico é pior e os pacientes são estagiados como M1c.

Com todas estas considerações, os pacientes com MC são classificados com estágio I e II quando não há evidências de metástases regionais ou à distância, estágio III quando os pacientes apresentam evidência clínica ou radiológica de metástases linfonodais regionais ou metástases em trânsito ou satelitose e estágio IV na presença de metástases à distância.

Quadro 1 - Estadiamento do melanoma cutâneo segundo a AJCC – 2001.

TUMOR	ESPESSURA	ULCERAÇÃO
T1	≤ 1 mm	A: sem ulceração e nível II/III
		B: com ulceração e nível IV/V
T2	1.01-2.00 mm	A: sem ulceração
		B: com ulceração
T3	2.01-4.0 mm	A: sem ulceração
		B: com ulceração
T4	>4.0 mm	A: sem ulceração
		B: com ulceração

LINFONODOS	Nº DE LINFONODOS	VOLUME DE METÁSTASE
N1	1 linfonodo	a: micrometástase*
		b: macrometástase**
N2	2-3 linfonodos	a: micrometástase*
		b: macrometástase**
		c: metástases em trânsito sem linfonodo metastático
N3	4 ou mais linfonodos ou linfonodos coalescentes ou metástases em trânsito ou satelitose mais linfonodos metastáticos	

*Micrometástases são diagnosticadas depois do linfonodo sentinela ou linfadenectomia eletiva

** Macrometástases são definidas como linfonodos clinicamente palpáveis confirmados por linfadenectomia ou quando a metástase linfonodal mostra nítida invasão extracapsular

cont/ Quadro 1

METÁSTASE	LOCAL	DHL SÉRICA
M1	Metástase cutânea, nodal ou TCSC	Normal
M2	Metástases pulmonares	Normal
M3	Todas demais metástases viscerais	Normal
	Qualquer metástase à distância	Elevada

Apesar de não fazerem parte do estadiamento atual do melanoma, vários outros fatores histológicos e clínicos devem também ser considerados na avaliação do prognóstico do paciente (SLOMINSKI et al. 1998).

Entre os fatores histológicos, o tipo histológico, a presença de regressão, o índice mitótico, o infiltrado inflamatório e a presença de invasão vascular, perineural ou linfática devem ser estudadas no tumor primário, pois também interferem na agressividade e conseqüentemente no prognóstico do paciente (BALCH et al. 2004; HOMSI et al. 2005).

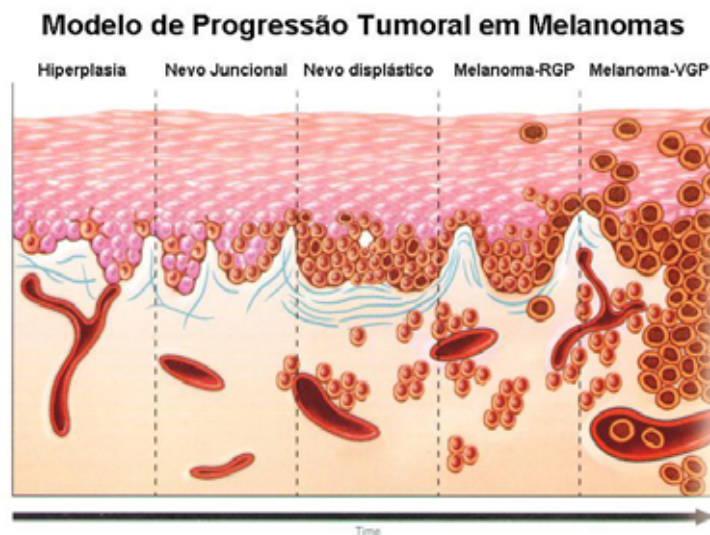
Quanto aos fatores clínicos, a idade, o sexo e a localização do tumor primário representam os principais dados que implicam no prognóstico do paciente. Pacientes mais idosos apresentam tumores mais espessos e ulcerados e segundo alguns autores a idade se comporta como um fator prognóstico independente (CHANG et al. 2003). Outros estudos indicam que o sexo feminino apresenta melhor prognóstico do que quando comparados com o

sexo masculino (MASBACK et al. 2001), e por fim, outros estudos relacionam um pior prognóstico na presença de lesões primárias da região de cabeça e pescoço e tronco (BALCH et al. 1982; BALCH et al. 2001a e b).

O tratamento do MC primário é basicamente cirúrgico e consiste na retirada da lesão com margens apropriadas, após a biópsia excisional. Em determinados casos há indicação de pesquisa do linfonodo sentinela (estádio IB, IIA e IIB) e linfadenectomia posterior, se o linfonodo sentinela for positivo. Pacientes com linfonodos clinicamente acometidos (estádio III) são submetidos diretamente à linfadenectomia. Pacientes com doença disseminada (estádio IV) são candidatos a tratamento sistêmico com quimioterapia, imunoterapia ou bioquimioterapia, mas o índice de resposta a estas modalidades terapêuticas permanece muito pequeno (ZALAUDEK et al. 2003). Mesmo sendo diagnosticado mais precocemente, o índice de mortalidade do melanoma tem permanecido constante, já que pouca melhora tem sido obtida no tratamento de pacientes com doença sistêmica nos últimos anos.

Com tudo isto posto, torna-se obrigatório que o diagnóstico do melanoma contenha todas as informações histopatológicas já descritas, dados estes que associados aos dados clínicos poderão predizer a evolução do paciente. Em algumas situações no entanto, a evolução ocorre de maneira diferente da esperada, nos fazendo acreditar que outros fatores, provavelmente moleculares, estejam envolvidos nesta evolução inesperada (HUSSEIN 2004). A variabilidade do comportamento clínico de pacientes com MC só é então em parte explicada pelos dados clínicos e histopatológicos.

Segundo CLARK et al. (1984) e CLARK (1991), o melanoma é uma neoplasia cuja progressão ocorre através de 5 estágios bem definidos, com características clínicas e histológicas também bem definidas (Figura 1).



Fonte: Adaptado de MURPHY e MIHM (1999)

Figura 1 - Modelo de progressão tumoral em melanomas.

O nevo comum aparece de uma hiperplasia melanocítica e é seguido pelo nevo displásico que já apresenta um nível maior de atipia arquitetural e estrutural. O estágio seguinte, definido como melanoma de crescimento radial, é o primeiro reconhecido como maligno. Nesta fase, as células são localmente invasivas mas não apresentam capacidade metastática. As células de crescimento radial podem progredir para a fase de crescimento vertical, onde há invasão dérmica e potencial para metástases à distâncias, que caracteriza o último estágio.

Apesar do grande avanço da biologia molecular, os mecanismos moleculares envolvidos nesta progressão ainda permanecem obscuros. Como exemplo, o aparecimento de metástases depende de um processo com vários estágios envolvendo seleção, migração, sobrevivência e crescimento de uma subpopulação de células com propriedades muito específicas, ainda totalmente desconhecidas. Estes fatores justificam a dificuldade encontrada no tratamento do melanoma disseminado e no desenvolvimento de terapias eficientes nesta situação.

Vários estudos no âmbito da biologia molecular vêm então sendo realizados na tentativa de determinar mecanismos moleculares associados com a evolução do melanoma, a maior parte deles utilizando linhagens celulares de melanoma ou amostras de tecidos metastáticos já que estudos com material obtido de melanomas primários são difíceis de serem realizados devido às limitações relacionadas com a obtenção de material da própria lesão primária.

A grande evolução da tecnologia genômica tem possibilitado o sequenciamento genético de vários organismos inclusive o humano. O armanejamento de todos estes dados tem colaborado com os pesquisadores na identificação e função de todo este material genético, já que o estudo do papel biológico dos genes e como eles são orquestrados no genoma podem ajudar a entender diversas patologias e principalmente identificar marcadores genéticos para a transformação maligna. Uma das maneiras para se estudar a função dos genes é determinando-se o perfil de expressão gênica. Isto pode ser realizado com várias técnicas como northern blots, SAGE (serial analysis of

gene expression) e mais recentemente com duas tecnologias baseadas em *arrays*, a DNA complementar *array* e a oligonucleotideo *array*.

A análise de expressão de genes em várias doenças e em particular em vários tipos de câncer ganhou grande alento após o trabalho de SCHENA et al. (1995), que desenvolveram uma sistemática para monitorar a expressão de vários genes em um estudo experimental com 45 genes de uma planta chamada *Arabidopsis thaliana*. Para tal, foi utilizada a técnica do cDNA (DNA complementar) *microarray* que proporciona a análise da expressão de milhares de genes simultaneamente.

A técnica de cDNA *microarray* é uma ferramenta importante para investigar processos biológicos através da análise de expressão de genes em grande escala a partir de uma célula em particular ou mesmo de determinado tecido biológico ou organismo. Para tal, milhares de probes de cDNA, cada qual representando um único gene, são colocados sobre um suporte sólido denominado chip. O princípio da técnica se apóia na hibridização específica entre os probes no chip e os alvos da amostra marcados (DERISI et al. 1996; DUGGAN et al. 1999; LOCKHART e WINZELER 2000; AITMAN 2001; BALDI et al. 2003a e b; MIRMOHAMMADSADEGH et al. 2004; BOWDEN e BRENNAN 2004; SELLHEYER e BELBIN 2004; KUNZ et al. 2004).

Geralmente, DNA *microarrays* são usados para monitorar mudanças nos níveis de expressão de genes, já que um único *microarray* pode analisar simultaneamente a expressão de milhares de genes através da quantificação de seus RNA mensageiros transcritos. A expressão de genes é estimada

comparando-se a quantidade relativa de mRNA em duas populações celulares distintas. O mRNA do controle e da amostra a ser testado é marcado com cores fluorescentes e depois da hibridização, a quantidade de mRNA colocada no chip é estimada pela intensidade da cor correspondente. Os níveis de mRNA encontrados na amostra e no controle são então comparados e pode se obter uma expressão diferencial.

Outras informações biológicas de importância podem ser obtidas através dos dados de *microarray* utilizando-se estudos computacionais complementares. Genes expressos de maneira similar podem ser organizados em clusters, gerando um perfil de expressão gênica e considerados como uma assinatura molecular da amostra. Além disso, genes muito ou pouco expressos consistentemente podem facilitar o entendimento de mecanismos envolvidos na resposta celular ao seu microambiente.

Durante condições patológicas, a atividade celular é regulada dinamicamente através de alterações específicas na expressão de genes, portanto dados de expressão gênica obtidos de *microarray* podem ser utilizados para correlacionar um fenótipo celular em particular. Estes perfis específicos de expressão gênica, também referidos como assinatura molecular, podem ser úteis na identificação de certas condições clínicas ou patologias.

Este novo conceito de assinatura molecular é a base para os testes diagnósticos de última geração que estão sendo desenvolvidos nesta era pós-genômica, podendo identificar de maneira precoce e precisa doenças

complexas multifatoriais como o câncer e até providenciando bases para uma terapia mais eficiente.

A implicação médica da tecnologia do *microarray* pode ser observada em várias publicações recentes na literatura, em várias áreas da oncologia, mas alguns trabalhos referentes a câncer mamário chamam a atenção por serem pioneiros a compararem o perfil de expressão de genes com a evolução clínica.

Utilizando DNA *microarrays*, MARTIN et al. (2001) conseguiram identificar 170 genes diferencialmente expressos em células de câncer mamário invasivo. Em amostras sanguíneas de 48 pacientes, os autores encontraram 12 genes com expressão aumentada (mais de 10 vezes). Resultados semelhantes foram também encontrados utilizando-se outras técnicas como PCR, atestando a validade dos dados obtidos por *microarray*. Utilizando estes 12 genes como marcadores moleculares, os pesquisadores foram capazes de identificar corretamente 77% dos pacientes com câncer mamário invasivo não tratáveis, demonstrando a aplicabilidade da expressão baseada em amostras sanguíneas para o diagnóstico de tumores sólidos.

VAN'T VEER et al. (2002) identificaram através de DNA *microarray*, 70 entre 25000 genes que se relacionavam com o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama. Assinaturas moleculares associadas com “pobre” ou “bom” prognóstico foram geradas baseadas no perfil de expressão destes 70 genes em 78 pacientes com câncer mamário esporádico divididos em 2 grupos: aqueles que desenvolveram metástases dentro de 5 anos do diagnóstico inicial e aqueles que não desenvolveram metástases no mesmo período. O mesmo

estudo também identificou uma assinatura molecular consistindo de 100 genes diferencialmente expressos em pacientes carregando mutações em BRCA1, um parâmetro importante para o diagnóstico preciso de câncer de mama hereditário.

Neste mesmo ano, VAN DE VIJVER et al. (2002) publicaram também uma expressão de genes que indicaria a evolução de pacientes com câncer de mama. Ambos estudos fizeram a análise da expressão gênica através do uso de DNA complementar *array*.

Em relação ao MC, a literatura mundial também tem se preocupado em relação ao reconhecimento de vários genes envolvidos na progressão tumoral escalonada utilizando métodos de análise de DNA, RNA e proteínas.

BISHOP (1997) já falava sobre a importância da biologia molecular do melanoma para o auxílio no diagnóstico de lesões duvidosas e na possibilidade de novos conhecimentos para o desenvolvimento de aspectos imunoterapêuticos.

BITTNER et al. (2000) propuseram uma classificação molecular para os melanomas cutâneos baseada no perfil de expressão gênica. Através da técnica de cDNA *microarray*, notaram que nos melanomas mais invasivos, alguns genes encontravam-se expressos diferentemente do que em melanomas com características fenotípicas distintas, concluindo que uma análise global de transcritos poderia identificar subtipos irreconhecíveis de melanoma e prever características fenotípicas que podem ser de importância para progressão da doença.

WANG et al. (2002) estudaram através do cDNA *microarray* a expressão gênica de amostras de melanomas metastáticos de pacientes submetidos a imunoterapia, mas contrariamente aos estudos nos quais a análise de transcritos identificaram grupos relevantes clinicamente em linfomas e câncer de mama, não observaram grupos de genes preditivos da evolução clínica nestes melanomas. O estudo gênico individual, no entanto, sugeriu que a resposta imunológica pode ser pré-determinada, concluindo que estudos futuros poderiam contribuir para elucidar a resposta dos pacientes aos diversos tipos de drogas.

Através de imunohistoquímica, STRAUME et al. (2000) concluem em seu trabalho que a perda da expressão da proteína p16 identificaria melanomas mais agressivos e estaria associado a maior proliferação celular.

BALDI et al. (2003a) identificaram, também por cDNA *arrays*, genes diferencialmente expressos em um modelo experimental de progressão de melanoma com duas linhagens celulares. Evidenciaram que a menor expressão do Edg-2 é um evento comum na progressão tumoral do melanoma.

No mesmo ano RUMPLER et al. (2003) et al. identificaram genes diferencialmente expressos em modelos de progressão tumoral de melanomas através de cDNA *microarray*. Encontraram que a expressão aumentada de SPARC (molécula envolvida na remodelagem de tecidos e angiogênese), MIF (importante modulador da progressão do ciclo celular e angiogênese) e catepsina Z (proteínase degradadora de matriz), caracterizavam fenótipos agressivos.

HOEK et al. (2004) identificou vários genes pouco ou muito expressos em melanomas metastáticos comparado com melanócitos normais. Para tal, utilizou oligonucleotídeos *arrays*.

PAVEY et al. (2004), utilizando um perfil de expressão gênica através de cDNA *microarray* de 61 linhagens celulares de melanoma, identificaram uma assinatura que prediz mutação no gene BRAF no melanoma, sugerindo até que este achado poderia colaborar na identificação de novos alvos terapêuticos para tratar melanomas carregando mutações em BRAF. Este achado vai de encontro aos achados de DAVIES et al. (2002), que também encontraram mutações de BRAF em melanomas.

NG et al. (2004) demonstraram que a expressão de XAF1 encontra-se reduzida no melanoma. Este fator XAF1 associa-se a XIAP (proteína inibidora da apoptose) e acaba inibindo a atividade anti-apoptótica desta proteína XIAP. Os autores sugerem também um papel de XAF1 na quimioresistência e progressão da doença.

MIRMOHAMMADSADEGH et al. (2004), usando cDNA *microarrays* e comparando melanomas primários com metástases, confirmaram que a predominância de proteínas anti-apoptóticas nas metástases de melanomas seria um pré-requisito para a progressão tumoral.

HELMKE et al. (2004) concluem em seu estudo que as metástases de melanoma estão associadas com maior expressão do gene sintenina, que pode participar na transdução de sinal e na propriedade de adesão celular.

ALONSO et al. (2004) concluem que anormalidades no checkpoint da transição G1/S contribuem de maneira marcante para a gênese e progressão do melanoma. Identificam novas proteínas envolvidas neste mecanismo como sendo possíveis alvos terapêuticos.

BACHMANN et al. (2004) concluem em seu estudo que a via p16-Rb apresenta importante função na progressão tumoral , enquanto alterações na via p14-p53 seriam menos importantes.

Mais recentemente, NAMBIAR et al. (2005) analisaram por cDNA *microarray*, a regulação de genes em dez amostras de melanomas metastáticos. Encontraram a expressão aumentada de vários genes, entre eles MAPKK6, c-met e GRB10, concluindo que a técnica utilizada encontra-se no contexto atual da pesquisa em melanoma.

No mesmo ano, HAQQ et al. (2005) compararam o perfil de expressão gênica em nevos, melanomas primários e metástases de melanomas, encontrando expressões distintas entre estas categorias. Chegaram a sugerir que seus resultados podem colaborar no desenvolvimento de novas drogas para melanomas metastáticos.

DE WIT et al. (2005), utilizando oligonucleotideo *array*, conseguem identificar 25 genes diferencialmente expressos entre nevos nevocelulares e melanomas metastáticos, sugerindo que estes genes estejam envolvidos na progressão tumoral.

De nosso conhecimento, poucos estudos conseguiram analisar os genes envolvidos na progressão do melanoma relacionando material obtido de lesões

primárias e um longo acompanhamento clínico. O mais recente, publicado por WINNEPENNINCKX et al. (2006), utilizou amostras de 83 tumores primários armazenados por congelamento no qual fizeram o estudo genético com oligonucleotídeo *microarray*. Identificaram 254 genes cuja expressão estava associada com o aparecimento de metástases nos primeiros 4 anos. Destas sequências, 174 corresponderam a genes conhecidos e destes genes conhecidos, 141 estavam pouco expressos e 33 estavam muito expressos em melanomas de pacientes que permaneceram livres de metástases por 4 anos. Setenta e cinco destes 174 genes foram descritos previamente como sendo relacionados à biologia do câncer, mas apenas 30 já haviam sido estudados no melanoma. Entre este grupo de 30 genes, estavam genes relacionados ao ciclo celular, mitose, inibição e estimulação da apoptose, ciclo da ubiquitina, sinalização intracelular e até mesmo da inibição da expressão de Mitf.

GYORFFY et al. (2006) tentou identificar perfis de expressão gênicas em melanomas reunindo 9 estudos que utilizaram diferentes plataformas tecnológicas. Encontrou pouca acurácia e reprodutibilidade, demonstrando a grande diversidade de perfil de expressão de genes associado com melanoma, sugerindo a necessidade de uma padronização desde a coleta das amostras, seu preparo até o estudo bioinformático.

Pela presença deste grande número de trabalhos com a preocupação de demonstrar a possibilidade de criação de classificadores moleculares para a definição de prognóstico em câncer, fica evidente que com base no perfil global de expressão gênica, é possível a classificação de amostras quanto ao seu

comportamento biológico. Dentre esses vários trabalhos, destaca-se o trabalho de VAN 'T VEER et al. (2002) onde fica evidente a enorme relevância de um banco de dados com uma informação sistematizada sobre os dados clínicos e anátomo-patológicos dos pacientes e dos tumores. Para tanto, é absolutamente necessária a criação de um banco de dados que possa substanciar a comparação entre parâmetros clínicos e moleculares.

Frente à importância clínica do melanoma e às grandes dificuldades em prever sua evolução mesmo com fatores clínicos e histopatológicos definidos, resolvemos fazer um estudo clínico para correlacionar a evolução de pacientes com melanoma com seu perfil de expressão de genes. Utilizando a metodologia de cDNA *array* para determinar a expressão gênica em larga escala de amostras de tumores primários e metastáticos, pretendemos comparar estes dados moleculares com parâmetros clínicos e biológicos dos tumores com o objetivo de construir classificadores que possam prever, a priori, a evolução do paciente e a resposta ou não a determinado tratamento. Para tal, a construção de um banco de dados de pacientes com MC, torna-se fundamental.

2 OBJETIVOS

Nossos objetivos neste estudo são:

1. Estabelecer e caracterizar um banco de dados para seguimento clínico e anatomo-patológico de pacientes com melanoma cutâneo primário e metastático.
2. Comparar dados clínicos e anatomo-patológicos com as análises moleculares para caracterizar classificadores que permitam prever resposta clínica ao tratamento e a evolução da doença.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DE PACIENTES

No período compreendido entre janeiro de 2003 e janeiro de 2006, todos os pacientes do Hospital do Câncer A. C. Camargo de São Paulo que apresentavam lesão primária ou metastática de MC foram elegíveis para o estudo. Para tal, os pacientes foram inicialmente orientados e posteriormente questionados sobre a possibilidade de participação neste estudo, o que só ocorria efetivamente após a assinatura pelo paciente ou seu responsável, do termo de consentimento previamente autorizado pela comissão de ética deste hospital. Foram também utilizados para o estudo amostras de melanomas primários e metastáticos armazenadas no banco de tumores do Departamento de Anatomia Patológica do mesmo Hospital.

Foram excluídos os pacientes que perderam seguimento do hospital ou aqueles cuja amostra tumoral não apresentava condições para extração adequada de RNA.

Após a etapa da retirada das amostras dos tumores, as etapas laboratoriais (Item 3.2 a 3.9) foram realizadas pela aluna de doutorado Waleska Keller Martins e fazem parte de sua tese também.

3.2 EXTRAÇÃO DO RNA

Após o procedimento cirúrgico para retirada da lesão primária ou metastática suspeita de melanoma, uma parte do tumor foi encaminhada para a extração do RNA. Estes fragmentos foram fixados em RNALater™ (Ambion, EUA) em volume de pelo menos 5 vezes o volume total do fragmento em cm³ (FLORELL et al. 2001). Em lesões pequenas, menores do que 2 centímetros, a peça foi inicialmente encaminhada para o banco de tumores do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo de São Paulo onde foi feita a separação do material para ser extraído o RNA sem causar prejuízo para o exame anátomo-patológico. Em lesões primárias maiores do que 2 centímetros, foi realizada a retirada de um fragmento com punch número 2 após exame dermatoscópico para se identificar a área de menor profundidade e que portanto não causaria prejuízo ao exame anátomo-patológico da lesão. Os dados destas amostras foram depositados em um banco de dados configurado segundo o programa Microsoft Access®.

Nos casos dos tumores provenientes do banco de tumores, os fragmentos foram acondicionados em criotubos devidamente identificados (T = tumor e N = normal adjacente; RGH = número do prontuário) e congelados em nitrogênio líquido, para posterior armazenamento em freezer a -140° C. Os dados destas amostras foram depositados em um banco de dados sob a responsabilidade do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do

Câncer A. C. Camargo e do Laboratório de Biologia Computacional do Hospital do Câncer A. C. Camargo.

3.3 VALIDAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS AMOSTRAS

Antes de serem processadas, todas as amostras foram submetidas à análise histológica, utilizando-se o material congelado ou fixado em RNALater™ (Ambion, EUA). Esta validação visa não somente a confirmação do diagnóstico, mas também a avaliação da amostra quanto à presença de necrose, infiltrado inflamatório, estroma, epiderme e tecido adiposo. Pelo fato do MC apresentar algumas limitações relevantes, tais como o elevado índice de necrose, como também a própria histologia da pele (contigüidade da epiderme e estroma), optamos por manter um critério mínimo de 60% do fragmento relativo à fração tumoral.

3.4 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

A extração do RNA total de alguns fragmentos tumorais foi efetuada, utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen™ Life Technologies, EUA). A avaliação da quantidade e grau de pureza do RNA total extraído foi efetuada em espectrofotômetro (GeneQuant, Clamart Cedex, França), onde se detecta absorbâncias a 230nm, 260nm e 280nm. As amostras consideradas como

ótimas e livres de contaminantes prejudiciais à técnica de amplificação *in vitro* apresentam razão 260/280 (entre 1.8 e 2.1) e razão 230/260 (entre 1.8 e 2.0). Para aquelas que esta razão for inferior ao estabelecido foi realizado extrações a pH 4.5 com fenol: clorofórmio: álcool-isoamílico na proporção 25:24:1 ou reprecipitação dos transcritos, com posterior lavagens em etanol a 75% (v/v). A qualidade do RNA total foi avaliada pela integridade dos RNAs ribossomais 28S e 18S, após o fracionamento eletroforético de 1,0 µg de RNA total, sob condições desnaturantes, em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio (4,5 µg/mL). Apenas aquelas amostras que apresentaram uma proporção dos transcritos ribossomais 28S/18S maior que um foram utilizadas no protocolo de cDNA microarrays (BITTNER et al. 2003).

3.5 AMPLIFICAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO E REFERÊNCIA

Para amplificação do RNA mensageiro e referência foi empregado o protocolo baseado na amplificação do RNA poly A⁺ pela T7-RNA polimerase. (WANG et al. 2000).

Resumidamente, 1,0 µL do Primer Oligo dT(24)-T7 a 500 ng/µL (Integrated DNA technologies, EUA) foi adicionado a 1,0-3,0 µg de RNA total, a um volume final de 8,1 µL de reação. O RNA total foi, então, desnaturado a 70° C por 10 minutos. Para aumentar a eficácia de anelamento do Primer Oligo dT(24)-T7 à porção 3' do mRNA, diminuimos a temperatura em banho de gelo

por 5 minutos. Esta região promotora do fago bacteriano foi incorporada à extremidade 5' dos cDNAs pela reação de transcrição reversa por adição de 4,0 μL de First-Strand Buffer 5X (SuperScript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen, EUA), 2,4 μL de MgCl_2 a 25mMol/L (ImProm-II™ Reverse Transcription System, Promega, EUA), 2,0 μL de Dithiotreitol a 0,1 Mol/L (DTT; SuperScript™ II Reverse Transcriptase; Invitrogen), 2,0 μL de mix-dNTPs a 10 mMol/L (Eppendorf, EUA), 0,5 μL de RNasin a 40U/ μL (RNasin® Plus RNase Inhibitor, Promega, EUA) e 1,0 μL de RTase (ImProm-II™ Reverse Transcription System, Promega, EUA). Para maior eficiência da síntese do cDNA incubou-se a reação a 25° C por 5 minutos; 42° C por 2 horas; seguido de aquecimento a 75° C por 15 minutos para desnaturação das enzimas empregadas. A segunda fita do cDNA foi sintetizada por adição, ao produto da reação anterior, de 16,7 μL de água tratada com DEPC (Merck, Germany) pH 7,0; 10,0 μL de Second-Strand Buffer 5X (Invitrogen, EUA); 1,0 μL de mix-dNTPs a 10 mMol/L (Eppendorf, EUA); 0,3 μL de RNase H 2,0U/ μL (Invitrogen, EUA); 0,5 μL de E. coli DNA ligase a 10U/ μL (Invitrogen, EUA); e 1,5 μL de DNA Polymerase I a 10U/ μL (Invitrogen, EUA). A reação de síntese do ds-cDNA foi efetuada por 2 horas a 16° C. Após este tempo, adicionou-se 1,0 μL de T4-DNA Polymerase a 5U/ μL (Invitrogen, EUA), seguido de incubação a 16° C por 10 minutos. Após a síntese dos ds-cDNAs, tanto o RNA ribossômico quanto as enzimas foram degradados com 20 μL de solução alcalina (EDTA a 0,25 Mol/L e NaOH a 1,0 Mol/L) sob aquecimento a 75° C por 20 minutos. Para

ajuste do pH do produto anterior, adicionou-se 20,0 μL de HCl a 1,0 Mol/L. Em seguida, adicionou-se 100 μL de água DEPC e 1,0 μL de acrilamida linear a 500 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ (Ambion, EUA). A esta mistura foi adicionado 170 μL da combinação de fenol: clorofórmio: álcool-isoamílico (25:24:1), com conseguinte inversão por 20 segundos e centrifugação a 14.000 RPM a 25° C por 5 minutos. A fase aquosa foi, então, repurificada por adição de 170 μL da mistura clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1), sob mesmas condições da extração orgânica anterior. A seguir, precipitou-se a fase aquosa, por 1:30 horas a -20° C, em etanol 70% (v/v) em presença de 90 μL de acetato de amônio a 7,5 Mol/L e 1,0 μL de acrilamida linear a 500 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$. Após a precipitação, lavou-se o precipitado com etanol 75% (v/v) por no mínimo três vezes. Uma vez lavado e devidamente seco, solubilizaram-se estes ds-cDNAs em 10,0 μL de água tratada com DEPC pH 7,0, para posterior amplificação in vitro, utilizando-se o kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production System—T7 (Promega, EUA).

Resumidamente, adicionaram-se aos 10,0 μL de ds-cDNAs 5,0 μL de tampão Ribomax 5X; 7,5 μL de mix de rNTP's a 25,0 mMol/L; e 2,5 μL do enzyme mix-T7-RNA polymerase. Esta reação foi incubada 37° C por 5 horas. O material amplificado (5' Poly (U) aRNA) foi purificado pelo método do TRizol® (Invitrogen™ Life Technologies, EUA), removendo-se ambos os ribonucleotídeos livres e ds-cDNAs templates. A concentração dos 5' Poly (U) aRNAs foi determinada por leitura da absorbâncias a 230nm, 260nm e 280nm em espectrofotômetro (GeneQuant, Clamart Cedex, France). Os perfis gerados

foram monitorados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (p/v) corado com de brometo de etídio (4,5 µg/mL).

Utilizou-se como RNA referência um pool de linhagem celular de melanoma humano (SKMEL-05, SKMEL-17, SKMEL-28, SKMEL-37 e SKMEL-188). Este RNA referência foi amplificado usando-se o Oligo dT(15)-T7, com conseqüente utilização de dois ciclos de amplificação (WANG et al. 2000; GOMES et al. 2003). Empregando-se este pool de transcritos como referência, evitou-se a perda de informação biológica. Isto porque, para a maioria dos genes, entre estas duas populações, tem-se uma identidade muito boa quanto ao seu perfil de expressão gênica, principalmente por se tratarem de genes altamente correlacionados ao MC humano.

3.6 CONSTRUÇÃO DA LÂMINA DE cDNA MICROARRAY

Para a construção da lâmina de cDNA microarray, foi utilizado cDNA microarrays confeccionados (CHANDRASEKHARAPPA e TEH 2003) no Laboratório de Genômica Funcional do ILPC/SP, contendo 144 spots vazios, 48 cDNAs controles e 4.608 diferentes seqüências de cDNAs - ORESTES provenientes do banco de clones do Projeto Genoma Humano do Câncer FAPESP/ILPC. Estas seqüências ORESTES foram selecionadas segundo alguns critérios estabelecidos pelo laboratório de Biologia Computacional:

- 1 As seqüências correspondem aos genes full-lengths, cuja seqüência completa encontra-se depositada no Banco de Dados National Center for Biotechnology Information (NCBI) Reference Sequence (RefSeq) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/> (PRUITT et al. 2005);
- 2 As seqüências não podem apresentar identidade maior que 85% em pelo menos 100 pares de bases com qualquer outro cluster presente no Banco de Dados UniGene <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/> (WHEELER et al. 2003);
- 3 As seqüências só podem ter um único mapeamento (hit) no DNA genômico;
- 4 As seqüências correspondem à extremidade mais 3' do gene orientado no genoma, sendo os últimos 100 pares de bases evitados, a fim de que a seqüência se localize antes do sítio de poliadenilação;
- 5 As seqüências são maiores que 300 pares de bases.

3.7 MARCAÇÃO INDIRETA

A marcação indireta, tanto dos 5' Poly (U) aRNAs em estudo quanto dos 5' Poly (U) aRNAs referência, foi realizada conforme o protocolo descrito por COX e colaboradores, em 2004, com algumas modificações. Resumidamente, 6,0 µg de 5'poly (U) aRNAs diluídos em 10,4 µL de água DEPC foram adicionados a 3,0 µL de Randon Primer a 5,0 µg/µL (dN6; Amersham

Pharmacia Biotech, UK); 2,0 μ L de mix-RNA controle, totalizando 15,4 μ L de reação que foi aquecido a 70° C por 10 minutos, e resfriado em banho de gelo por 5 minutos. A transcrição reversa randômica foi realizada ao adicionar-se 8,0 μ L de First-Strand Buffer 5X (ImProm-II™ Reverse Transcription System, Promega, EUA); 9,6 μ L de $MgCl_2$ a 25,0 mMol/L; 4,0 μ L de mix- dNTPs-aminoallyl dUTP composto por 5,0 mMol/L de dATP; dCTP; dGTP; 2,0 mMol/L dTTP (Clontech, EUA) e 3,0 mMol/L de 5-3-aminoallyl-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate aa-dUTP (Sigma, EUA); 1,0 μ L de RNasin a 40U/ μ L (RNasin® Plus RNase Inhibitor, Promega, EUA) e 2,0 μ L de RTase (ImProm-II™ Reverse Transcription System, Promega, EUA). A mistura foi incubada a 25° C por 10 minutos e 42° C por 2 horas; e os 5' Poly (U) aRNAs foram degradados por adição de 20,0 μ L de solução alcalina (EDTA a 0,25 Mol/L e NaOH a 1,0 Mol/L) durante 20 minutos a 75° C. Para ajuste do pH do produto anterior, adicionou-se 20,0 μ L de HCl a 1,0 Mol/L. A seguir, precipitou-se esta mistura em 300 μ L de isopropanol acrescido de 200 η g de acrilamida linear e 2,0 μ L de glicogênio a 20 μ g/ μ L, por 10 minutos à temperatura ambiente.

Esta metodologia possibilitou a incorporação enzimática da molécula aa-dUTP à molécula de cDNA, que após precipitação e lavagens em etanol a 75% (v/v), foi então solubilizada em solução de bicarbonato de sódio a 0,065M pH 9.0 e fracionado em duas distintas reações de acoplamento relativas à incorporação química das moléculas fluorescentes amino-reativas: os ésteres succinidimil alexafluor 555 e 647 (Molecular Probes – Invitrogen®). Após a

incorporação dos ésteres, realizou-se a purificação dos cDNAs marcados em coluna QIAquick PCR Purification (Qiagen, EUA). Após a sua purificação, ambas as populações de cDNA marcado (amostra e referência) foram reunidas em um único tubo, ao qual adicionaram-se 2,0 μ L de DNA poly (A) a 1,0 μ g/ μ L (Amersham Biosciences, EUA) e 2,0 μ L de Human Cot-1 DNA[®] a 1,0 μ g/ μ L (Invitrogen, EUA). A seguir, Reduziu-se o volume ($\sim$ 200 μ L) em Savant Speed Vac Concentrator (Savant, EUA) até um volume de aproximadamente 8,0 μ L. A seguir, adicionou-se 50,0 μ L de tampão de hibridização (2X de SSC, 0,2% (p/v) de SDS, 50X de Denhardt's); 40,0 μ L de formamida e 2,0 μ L de esperma de salmão a 5,0 μ g/ μ L. Manteve-se esta mistura sob agitação a 500RPM a 45° C até o seu uso.

3.8 HIBRIDIZAÇÃO

As etapas de pré-hibridização, hibridização e lavagem das lâminas foram realizadas conforme descrito por BITTNER et al. (2003). Inicialmente ss lâminas de cDNA microarrays foram pré-hibridizadas em 20 mL de solução contendo 5X de SSC; 5X de Denhardt's; 0,1% (p/v) de SDS; e 1,0 % (p/v) de albumina bovina (BSA) por pelo menos 12 horas a 42° C.

Após a pré-hibridização, as lâminas foram lavadas em água MilliQ a 42° C por alguns segundos, e centrifugadas a 1.500g por 1 minuto para secagem. Para enfim, serem montadas na estação de hibridização (Genomic Solutions,

EUA). Os cDNAs marcados, em 100 μ L de tampão de hibridização, foram aquecidos a 95° C por 5 minutos e mantidos a 70° C até sua aplicação sobre a lâmina. A reação de hibridização ocorreu sob as seguintes condições desnaturantes: 70° C por 5 minutos; 55° C por 45 minutos e a 42° C por pelo menos 20 horas. Uma vez hibridizadas, as lâminas foram submetidas às seguintes lavagens: duas vezes em solução de SSC 2X (filtrado e pré-aquecido a 42° C) por 10 minutos à temperatura ambiente; duas vezes em solução de SSC 0,1X e SDS 0,1% (p/v) (filtrado e pré-aquecido a 42° C) por 10 minutos à temperatura ambiente; e finalmente, duas vezes em solução de SSC 0,1X (filtrado e pré-aquecido a 42° C) por 10 minutos à temperatura ambiente. Enfim lavadas, seguiu-se centrifugação a 1.500g por 1 minuto para secagem. Já devidamente lavadas e secadas, realizou-se o processo de digitalização das lâminas e capturação das imagens em formato 16-bit TIFF.

3.9 DIGITALIZAÇÃO DAS IMAGENS

Os sinais gerados foram capturados por scanner confocal a laser (ScanArrayTM Express Microarray Acquisition System – Packard BioScience Biochip Technologies), usando-se uma resolução de 10 microns e sensibilidade de captação PMT de 60% para ambos os canais. Os principais valores de interesse produzidos pelo método de análise da imagem (segmentação e correção do background) foram os pares de intensidade (R, G) para cada cDNA

ORESTES em cada array. Cada hibridização produziu um par de imagens 16-bit TIFF (Tagged Information File Format) que foram avaliadas aplicando-se o método Histograma do software ScanArrayTM Express – Packard BioScience Biochip Technologies, conforme descrito por BALL et al. em 2003. Após a análise da imagem, para cada cDNA ORESTE da lâmina ILPC-4.8K, denotou-se como “dado de expressão” os dois valores de intensidade (R, G). Desta forma, o composite da imagem alexa-fluor 555 (GREEN) versus alexa-fluor 647 (RED) reflete, em termos de intensidade da coloração verde-vermelha, a abundância relativa daquele particular cDNA ORESTE avaliado.

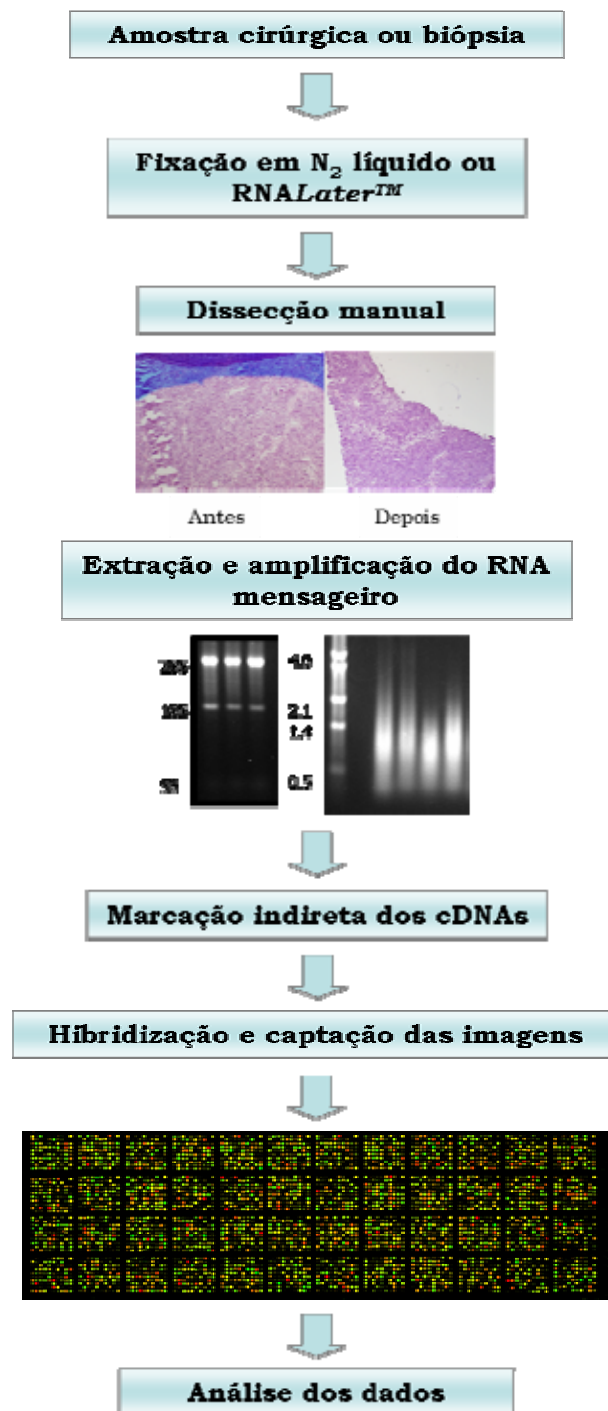


Figura 2 - Esquema da metodologia utilizada para a obtenção do perfil de genes através de cDNA *microarray*.

3.10 SEGUIMENTO CLÍNICO

O seguimento clínico dos pacientes foi realizado utilizando-se o protocolo de atendimento do Grupo Brasileiro de Melanoma modificado pelo Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital do Câncer A. C. Camargo de São Paulo onde constam as seguintes informações de cada paciente:

- Identificação;
- Características físicas;
- Histórico pessoal e familiar;
- Presença de lesões precursoras;
- Época do diagnóstico;
- Características clínicas da lesão primária;
- Tratamento inicial da lesão primária;
- Histologia da lesão primária com todos os fatores prognósticos referentes ao melanoma cutâneo;
- Tratamento loco-regional;
- Estadiamento inicial;
- Tratamento adjuvante;
- Época do aparecimento de metástases e mudança de estadiamento;
- Tratamento sistêmico;

- Status do paciente. Em julho e agosto de 2006 finalizou-se o seguimento dos pacientes, que foram classificados como: vivo com ou sem doença, morte por câncer e morto por outras causas.

Para adequado preenchimento deste banco de dados no que se diz respeito à evolução clínica destes pacientes, o seguimento foi feito a cada 3 meses nos dois primeiros anos do diagnóstico e a cada 6 meses nos anos subseqüentes, conforme o recomendado pela NCCN. Nas situações onde se utilizou material proveniente do banco de tumores, foi feito um estudo clínico retrospectivo de cada paciente e os dados iniciais do tumor e do paciente foram obtidos dos respectivos prontuários. Esses pacientes foram seguidos clinicamente da mesma maneira.

De acordo com as características clínicas e histopatológicas de cada paciente e seguindo-se o modelo de prognóstico de pacientes com melanoma localizado descrito por SOONG et al. (1992, 2003), os pacientes foram classificados de acordo com a chance de sobrevida em 5 anos. Nesta tabela, os autores levaram em consideração a espessura do tumor (Breslow), a presença ou não de ulceração, o nível de Clark (para lesões com Breslow < 1mm), a localização do tumor primário e a idade do paciente ao diagnóstico. Os pacientes que de acordo com este modelo apresentavam percentual de sobrevida acima de 60% em 5 anos foram considerados como sendo de bom prognóstico, enquanto aqueles abaixo deste valor foram considerados com sendo de mau prognóstico.

Para a classificação do prognóstico dos pacientes que não apresentavam Breslow e que apresentavam metástases regionais, também utilizamos o modelo de prognóstico descrito por SOONG et al. (2003) para estes pacientes. Para tal, levaram em consideração o número de nódulos metastáticos, a presença de ulceração, o local da lesão primária e a idade do paciente. Da mesma maneira, os pacientes que de acordo com este modelo apresentavam percentual de sobrevida acima de 60% em 5 anos foram considerados como sendo de bom prognóstico, enquanto aqueles abaixo deste valor foram considerados como sendo de mau prognóstico.

Os pacientes também foram divididos de acordo com a evolução clínica apresentada. Para tal classificação, utilizamos o período de sobrevida. Desta maneira, pacientes que apresentaram óbito causado pelo melanoma antes dos 5 anos de seguimento a partir da data do diagnóstico, foram classificados como tendo má evolução. Pacientes vivos após os 5 anos do diagnóstico foram considerados como tendo boa evolução. Para os pacientes vivos com seguimento inferior a 5 anos foram considerados como tendo boa evolução na eventualidade de estarem sem doença. Na presença de doença, foram considerados como má evolução se o aparecimento da metástase tenha acontecido nos 2 primeiros anos de seguimento. Desta forma, conseguimos dividir os pacientes estudados em 4 grupos diferentes:

- A** Pacientes com bom prognóstico e boa evolução;
- B** Pacientes com bom prognóstico e má evolução;
- C** Pacientes com prognóstico ruim e boa evolução;

D Pacientes com prognóstico ruim e má evolução.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados obtidos no banco de dados foi realizada usando-se o pacote estatístico SPSS 10.0 para Windows. Para o estudo de nossa casuística, foi aplicada estatística descritiva com a finalidade de observar frequência, média e mediana das variáveis sexo, idade, tipo histológico do tumor primário e localização do tumor primário. Para a análise comparativa dos dados entre as variáveis Breslow vs status do paciente e ulceração vs status do paciente foi aplicado o Teste de Qui-quadrado ou o Teste Exato de Fisher, a fim de verificar a existência de associação entre as variáveis, considerando um nível de significância de 0,05. Foram realizadas curvas de sobrevida de acordo com o método de Kaplan-Meier e foram comparados os resultados usando o teste não paramétrico de Log-rank.

Para a comparação das diferenças entre os níveis de expressão dos diversos genes estudados utilizamos modelos de análise de variância (ANOVA) e testes de Wilcoxon (equivalente ao teste de Mann-Whitney). O principal modelo de ANOVA utilizado envolveu a utilização dos fatores clínicos de prognóstico (bom ou mau) e evolução clínica (boa ou má) dos pacientes juntamente com o fator de interação entre eles. Após o ajuste do modelo, testamos a diferença de expressão entre má e boa evolução fixando bom

prognóstico, entre mau e bom prognóstico fixando boa evolução clínica e para o termo de interação entre os dois fatores. Esses testes foram feitos a partir da estatística t moderada proposta por SMYTH (2004).

A expressão gênica observando-se as variáveis tipo histológico e localização do tumor primário foi testada através da estatística F moderada (SMYTH 2004) após o ajuste de modelos de ANOVA de um fator. As demais variáveis clínicas estudadas apresentavam apenas dois níveis e foram estudadas através da utilização do teste de Wilcoxon, que é um teste não paramétrico para a diferença entre as medianas de duas amostras aleatórias. Todo gene com nível descritivo menor que 0,05 foi declarado como diferencialmente expresso, de acordo com o teste realizado.

4 RESULTADOS

Foram obtidas amostras de melanoma primários (65) e metastáticos (123) de 188 pacientes. No entanto, dessas amostras, 125 foram excluídas por apresentarem muita necrose e uma fração tumoral menor do que 60%, inviabilizando a obtenção de material genético adequado. Ao final de nosso estudo conseguimos obter uma quantidade de RNA adequado em amostras de 63 pacientes, sendo que em 20 destes pacientes o material genético foi obtido de tumores primários e em 43 de tumores metastáticos. Os dados clínicos destes 63 pacientes foram então classificados em um banco de dados para poderem ser comparados com o perfil de expressão de genes obtidos pelo cDNA microarray

O seguimento clínico variou desde 1 mês até 258 meses, com uma média de 48,84 meses e uma mediana de 39 meses.

Em relação ao sexo, 33 pacientes (52,4%) foram do sexo masculino e 30 (47,60%) do sexo feminino. Quanto à idade do paciente na época do diagnóstico, pudemos observar a Figura 3, sendo que a idade variou entre 20 e 94 anos, com média de 56 anos.

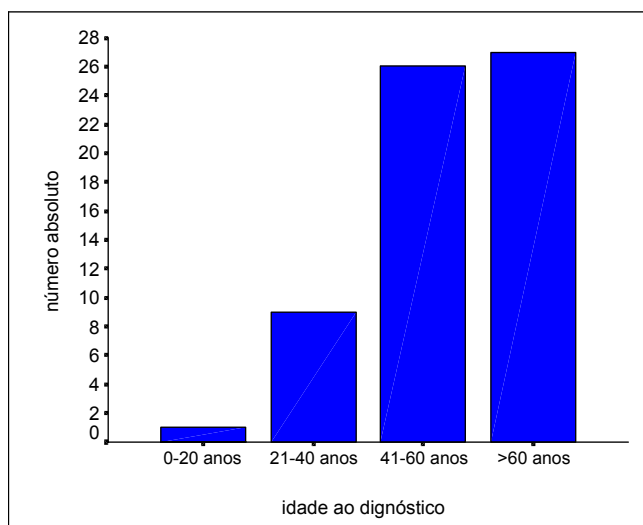


Figura 3 - Classificação dos pacientes de acordo com a faixa etária à época do diagnóstico.

O tipo histológico mais freqüente do tumor primário foi o melanoma extensivo superficial (27%), mas em 21 casos (33,3%) não conseguimos acesso a esse dado (outros) (Figura 4). O sítio mais freqüente de localização do tumor primário foi o membro inferior (Figura 5).

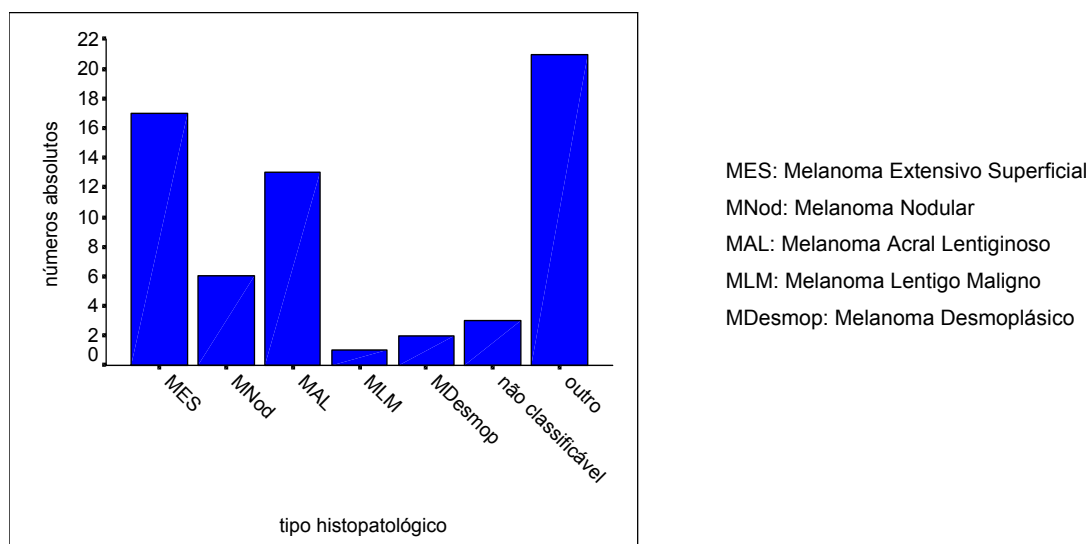


Figura 4 - Classificação dos pacientes de acordo com o tipo histológico do tumor primário.

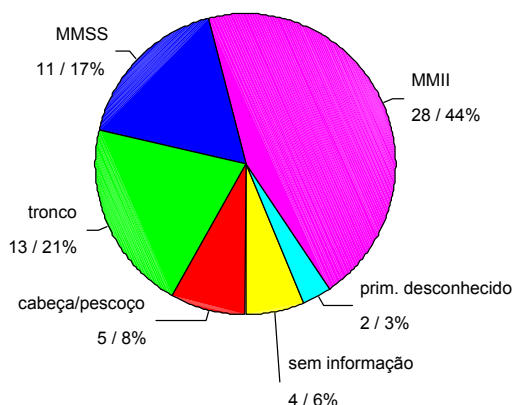


Figura 5 - Classificação dos pacientes de acordo com a localização do tumor primário.

Vinte e oito vírgula seis por cento (28,6%) dos pacientes estudados eram do fototipo de pele I e II (segundo a classificação de Fitzpatrick) e 59,6 % não relataram exposição solar intensa relacionada com a profissão.

A maior parte dos indivíduos estudados eram da raça branca (85,7%). Nove pacientes (14,3%) apresentavam histórico pessoal de MC e apenas 4 (6,3%) apresentavam antecedente familiar da doença.

O antecedente de nevo melanocítico atípico foi detectado em apenas 1 paciente (1,6%), mas a presença de nevos múltiplos foi percebida em 11 pacientes (17,5%). Destes pacientes com nevos múltiplos, 3 apresentavam mais de 50 nevos.

Quatorze pacientes (22,2%) relataram ao menos um episódio prévio de queimadura solar, na infância ou na fase adulta.

Dos 63 pacientes estudados, 33 (52.4%) evoluíram com metástases à distância. Alguns destes pacientes evoluíram com vários locais de metástases, mas o sítio mais freqüente foi o pulmão com 32 pacientes (96.9% dos pacientes com metástases a distância), seguido da pele e subcutâneo com 28 (44.4%), linfonodo com 15 pacientes (23,8), osso e cérebro com 10 pacientes (15.8%) e por último o fígado com 7 casos (11.7%).

Tabela 1 - Características clínicas e histopatológicas da população estudada.

VARIÁVEIS	PACIENTES (%) – N = 63
Idade(anos)	
Média	56
Variação	20 – 94
Sexo	
Feminino	30 (47,6)
Masculino	33 (52,4)
Fototipo de pele	
Tipo I e II	18 (28,6)
Demais tipos	44 (69,8)
Sem informação	01 (1,6)
Profissão	
Grande exposição solar	18 (28,6)
Sem grande exposição solar	35 (59,6)
Sem informação	10 (15,9)
Cor	
Branca	54 (85,7)
Não Branca	09 (14,3)
História pessoal de melanoma	
Sim	09 (14,3)
Não	36 (57,1)
Sem informação	18 (28,6)
História familiar de melanoma	
Sim	04 (6,3)
Não	41 (65,1)
Sem informação	18 (28,6)
Histórico de nevo atípico	
Sim	01 (1,6)
Não	39 (61,9)
Sem informação	23 (36,5)
Presença de múltiplos nevos	
Sim	11 (17,5)
Não	29 (46,0)
Sem informação	23 (36,5)
Se nevo melanocítico múltiplo	
< 50	08 (72,7)
>50	03 (27,7)

Cont/ Tabela 1

VARIÁVEIS	PACIENTES (%) – N = 63
Queimadura solar	
Infância	05 (7,9)
Adulto	05 (7,9)
Ambos	04 (6,3)
Não	21 (33,3)
Sem informação	28 (44,1)
Seguimento (meses)	
Variação	1 – 258
Média	48,84
Mediana	39
Tipo histológico do tumor primário	
Extensivo superficial	17 (26,9)
Nodular	06 (9,5)
Acral lentiginoso	13 (20,6)
Lentigo Maligno	01 (1,5)
Desmoplásico	02 (3,1)
Não classificável	03 (4,7)
Sem informação	21 (33,3)
Localização do tumor primário	
MMSS	11 (17,4)
MMII	28 (44,4)
Tronco	13 (20,6)
Cabeça e Pescoço	05 (7,9)
Primário Desconhecido	02 (3,1)
Sem informação	04 (6,3)
Espessura de Breslow	
T1	07 (11,1)
T2	04 (6,3)
T3	12 (19,0)
T4	23 (36,5)
Sem informação	17 (26,9)
Ulceração	
Ausente	22 (34,9)
Presente	23 (36,5)
Sem informação	19 (30,1)
Regressão	
Ausente	30 (47,6)
Presente	07 (11,1)
Sem informação	26 (41,2)

Cont/ Tabela 1

VARIÁVEIS	PACIENTES (%) – N = 63
Nível de Clark	
I	0
II	01 (1,5)
III	15 (23,80)
IV	17 (26,9)
V	14 (22,2)
Sem informação	16 (25,3)
Índice Mitótico	
0	02 (3,1)
1 a 6	18 (28,5)
> 6	20 (31,7)
Sem informação	23 (36,5)
Status linfonodal	
N0	22 (34,9)
N1	17 (26,9)
N2	04 (6,3)
N3	20 (31,7)
Metástases a distância	
Ausente	30 (47,6)
Presente	33 (52,4)
Tipo de metástase à distância	
Pulmão	32 (50,7)
Cérebro	10 (15,8)
Fígado	07 (11,1)
Osso	10 (15,8)
Linfonodo	15 (23,8)
TCSC	28 (44,4)

Relacionando-se o índice de Breslow com o status dos pacientes, obtivemos a Figura 6. Fazendo a análise estatística através do teste de Qui-quadrado, o status do paciente em relação ao índice de Breslow foi estatisticamente significativa ($p= 0,023$), sendo que quanto maior o Breslow, maior o número de óbitos.

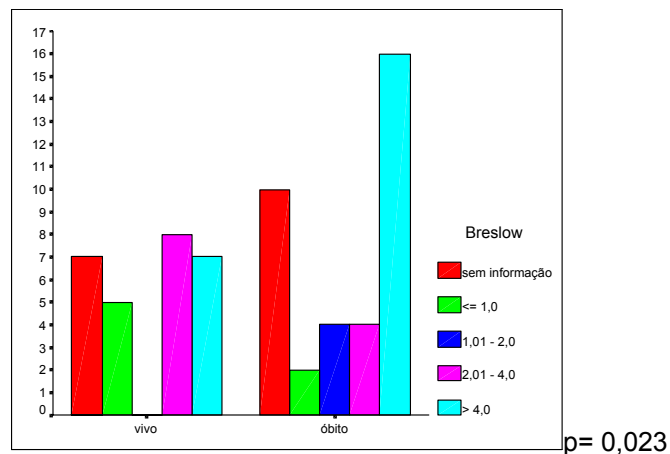


Figura 6 - Relação entre o índice de Breslow e o status de sobrevida na população estudada.

Comparando o mesmo status dos pacientes com a presença de ulceração, foi obtida a Figura 7. Não houve diferença estatisticamente significativa para a variável ulceração em relação ao status do paciente ($p=0,23$), também se utilizando o teste do Qui-quadrado. Em ambos os casos, para realização desta análise foi levado em consideração apenas os óbitos causados por câncer, sendo descartados os pacientes que morreram por outras causas (3 pacientes no total).

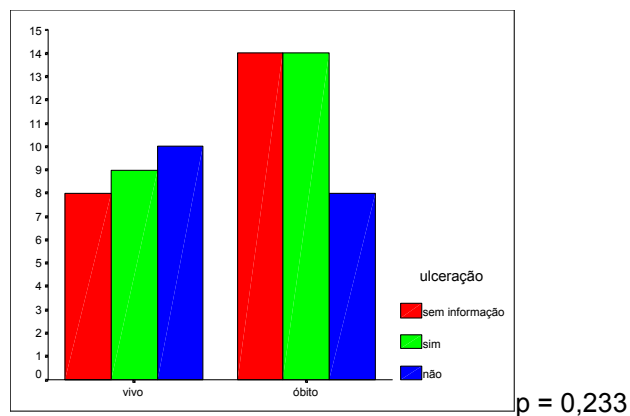


Figura 7 - Relação entre a presença de ulceração e o status de sobrevida na população estudada.

Foram ainda realizadas curvas de tempo livre de doença e tempo de sobrevida global em nossa casuística, demonstradas nas Figuras 8 e 9.

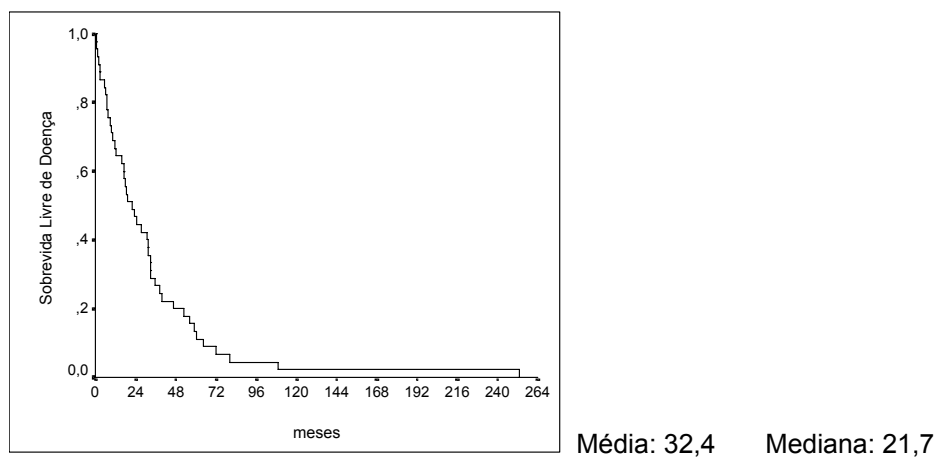


Figura 8 - Tempo livre de doença em meses na população estudada.

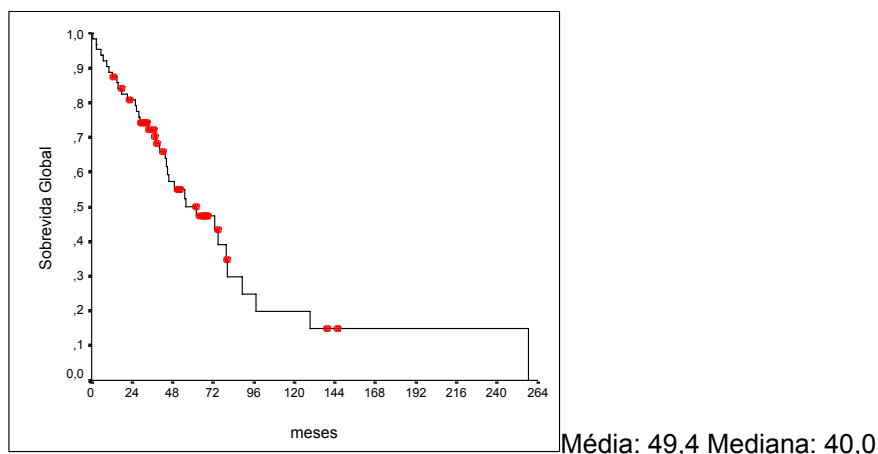


Figura 9 - Tempo de sobrevivência global em meses na população estudada.

De acordo com o descrito previamente, classificamos os pacientes em 4 diferentes grupos de acordo com seu prognóstico esperado e sua evolução apresentada:

- A Pacientes com bom prognóstico e boa evolução: 18 pacientes;
- B Pacientes com bom prognóstico e má evolução: 08 pacientes;
- C Pacientes com prognóstico ruim e boa evolução: 19 pacientes;
- D Pacientes com prognóstico ruim e má evolução: 18 pacientes.

Tabela 2 - Classificação dos pacientes em grupos levando em consideração seu prognóstico esperado e a evolução apresentada.

Prognóstico	Evolução	
	Boa	Má
Bom	18	08
Ruim	19	18

Testamos a diferença de expressão de genes entre os pacientes que tiveram má e boa evolução fixando-se inicialmente bom prognóstico e depois entre os pacientes que tinham mau e bom prognóstico fixando-se o parâmetro boa evolução clínica. Por último foi realizado o termo de interação entre os dois parâmetros fixados (boa evolução e bom prognóstico).

A Tabela 3 mostra os resultados dos genes diferencialmente expressos na primeira situação, não tendo sido encontrado nenhum gene diferencialmente expresso de maneira significativa. No entanto, os dois primeiros genes, AP3B2 (adapter related protein complex 3, Beta 2 subunit) e UGCGL2 (UDP glucose ceramide, glycosyltransferase like 2) apresentaram um valor de p muito próximo a 0,05. O valor positivo de AP3B2 significa que este gene está mais expresso no grupo de pacientes com má evolução. Contrariamente, o valor negativo de UGCGL2 significa uma menor expressão deste gene no grupo de pacientes com má evolução.

A Tabela 4 mostra os resultados dos genes diferencialmente expressos ao se fazer a diferença de expressão entre mau e bom prognóstico fixando-se o fator boa evolução clínica. Novamente não foi encontrado nenhum gene diferencialmente expresso de maneira significativa.

A Tabela 5 mostra o resultado da expressão dos genes fazendo-se a interação entre os dois fatores fixados previamente (bom prognóstico e boa evolução). Nessa situação, AP3B2 e UGCGL2 mostraram-se com pvalor $< 0,05$.

Tabela 3 - Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão entre má e boa evolução fixando bom prognóstico *.

Gene	Genbank	Unigene	Nome	Fold	Statistic	Pvalor
AP3B2	BI017571	Hs.199593	adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit	0.5427	4.7906	0.0518
UGCGL2	AW370265	Hs.308242	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 2	-1.1548	-4.5224	0.0668
SP192	BI049073	Hs.169854	hypothetical protein SP192	-0.5508	-3.8072	0.1285
SAT	BE695705	Hs.28491	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	0.9798	3.973	0.1285
NRBP	BE693578	Hs.272736	nuclear receptor binding protein	1.7931	3.8576	0.1285
ARGBP2	BQ327343	Hs.445072	Arg/Abl-interacting protein ArgBP2	0.3409	3.8168	0.1285
PIK3C3	BE066048	Hs.418150	phosphoinositide-3-kinase, class 3	-1.118	-3.7729	0.1285
FES	BF748528	Hs.7636	feline sarcoma oncogene	-1.3119	-3.8613	0.1285
PRKWNK1	BI009627	Hs.275999	protein kinase, lysine deficient 1	-0.277	-3.8778	0.1285
GNPDA1	BC022322	Hs.278500	glucosamine-6-phosphate deaminase 1	0.7337	4.0777	0.1285
MGC:13379	BF093916	Hs.26745	HSPC244	0.7003	3.9814	0.1285
PRPSAP1	AW798421	Hs.77498	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 1	0.6805	3.7713	0.1285
MYCBP2	AW935046	Hs.151411	MYC binding protein 2	-1.0581	-3.799	0.1285
COMMD3	BC011652	Hs.380403	COMM domain containing 3	-0.7468	-3.7038	0.1382
RNF141	AW854184	Hs.44685	ring finger protein 141	-1.1866	-3.7085	0.1382

*apenas alguns genes com pvalor mais próximo de 0,05.

Tabela 4 - Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão entre mau e bom prognóstico fixando boa evolução *.

Gene	Genbank	Unigene	Nome	Fold	Statistic	Pvalor
LOC126917	BF367880	Hs.511805	hypothetical protein LOC126917	-0.1785	-3.8849	0.5778
RAD51C	BE818297	Hs.412587	RAD51 homolog C (S. cerevisiae)	0.5056	4.0257	0.5778
SYP	AW386757	Hs.75667	synaptophysin	0.0155	0.0427	0.9976
DEPDC6	AW375857	Hs.87729	DEP domain containing 6	-0.1045	-0.814	0.9976
ARID1B	AW866577	Hs.436008	AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)	-0.0552	-0.5573	0.9976
AREG	AW819771	Hs.270833	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	-0.3603	-1.4405	0.9976
GRB7	BG009559	Hs.86859	growth factor receptor-bound protein 7	-0.2999	-1.7648	0.9976
TLOC1	BF744399	Hs.158193	translocation protein 1	-0.0515	-0.4976	0.9976
SMPD1	BF920775	Hs.77813	sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal (acid sphingomyelinase)	-0.1085	-0.7641	0.9976
CBLB	BI044792	Hs.436986	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b	0.25	0.9552	0.9976
ANGPTL2	AW385297	Hs.8025	angiopoietin-like 2	0.3657	1.5281	0.9976
KIAA0483	BE005796	Hs.64691	KIAA0483 protein	0.0447	0.5539	0.9976
TNFAIP1	BF873449	Hs.76090	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	0.066	0.4405	0.9976
DOCK7	BF943497	Hs.406156	dedicator of cytokinesis 7	0.1062	1.4933	0.9976
TMEM10	BF958613	Hs.12449	transmembrane protein 10	0.0344	0.753	0.9976
NANS	BE833238	Hs.274424	N-acetylneuraminic acid synthase (sialic acid synthase)	0.1642	0.7436	0.9976

*apenas alguns genes com pvalor mais próximo de 0,05.

Tabela 5 - Análise da expressão de genes após interação entre os dados obtidos fixando-se bom prognóstico e boa evolução *.

Gene	Genbank	Unigene	Nome	Fold	Statistic	Pvalor
AP3B2	BI017571	Hs.199593	adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit	-0.6724	-4.7631	0.0422
UGCGL2	AW370265	Hs.308242	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 2	1.4805	4.653	0.0422
FES	BF748528	Hs.7636	feline sarcoma oncogene	1.7163	4.054	0.2206
PSMD7	BF813722	Hs.440604	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7 (Mov34 homolog)	0.8733	3.8227	0.283
RNF141	AW854184	Hs.44685	ring finger protein 141	1.5323	3.8433	0.283
PIK3C3	BE066048	Hs.418150	phosphoinositide-3-kinase, class 3	1.3871	3.7565	0.2919
MYCBP2	AW935046	Hs.151411	MYC binding protein 2	1.2804	3.6892	0.3102
SP192	BI049073	Hs.169854	hypothetical protein SP192	0.6523	3.6187	0.3238
PRPSAP1	AW798421	Hs.77498	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 1	-0.8085	-3.5961	0.3238
IRF7	BE769486	Hs.166120	interferon regulatory factor 7	1.2432	3.3123	0.6506
UCHL3	BE929316	Hs.77917	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase)	0.9293	3.3034	0.6506
NDP52	BE173329	Hs.154230	nuclear domain 10 protein	-0.3091	-3.2389	0.6645
MCF2L	BF944508	Hs.436905	MCF.2 cell line derived transforming sequence-like	-0.2448	-3.1918	0.6645

*apenas alguns genes com pvalor mais próximo de 0,05.

Foi feita também a comparação de expressão gênica entre os pacientes dividindo-os de acordo com algumas variáveis como sexo, idade (maior e menor que 60 anos), localização do tumor (área exposta ao sol, não exposta e acral), subtipo histológico, presença de regressão, presença de ulceração, Breslow (T1, T2, T3, T4) e índice mitótico (0, 1 a 6, >6).

Individualizando-se a variável sexo, o gene JARID1D (AT rich interactive domain 1 D, RBP2 like) apresentou-se mais expresso no sexo feminino numa proporção estatisticamente significativa (Tabela 6).

Individualizando-se a variável tipo histológico, o gene COL 16 A1 (collagen type XVI alpha 1) apresentou-se diferencialmente expresso com $p < 0,05$ (Tabela 7).

No estudo das outras variáveis não foi encontrado nenhum gene diferencialmente expresso de maneira significativa (Tabelas respectivas no anexo).

Tabela 6 -Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão no sexo feminino e masculino *.

Gene	Genbank	Unigene	Nome	Fold	Statistic	Pvalor
JARID1D	AW368271	Hs.80358	Jumonji, AT rich interactive domain 1D (RBP2-like)	-2.2652	47	0
FLJ22021	BF852164	Hs.7258	hypothetical protein FLJ22021	0.1407	775	0.6379
HSHIN1	BF376199	Hs.252722	HIV-1 induced protein HIN-1	-0.1334	257	0.7036
SYP	AW386757	Hs.75667	synaptophysin	-0.3649	408	1
DEPDC6	AW375857	Hs.87729	DEP domain containing 6	0.1069	507	1
ARID1B	AW866577	Hs.436008	AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)	-0.0092	489	1
AREG	AW819771	Hs.270833	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	-0.1706	504	1
GRB7	BG009559	Hs.86859	growth factor receptor-bound protein 7	-0.1007	483	1
TLOC1	BF744399	Hs.158193	translocation protein 1	-0.056	419	1
SMPD1	BF920775	Hs.77813	sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal (acid sphingomyelinase)	0.1178	609	1
CBLB	BI044792	Hs.436986	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b	-0.2596	403	1
ANGPTL2	AW385297	Hs.8025	angiopoietin-like 2	0.0549	516	1
KIAA0483	BE005796	Hs.64691	KIAA0483 protein	-0.0157	463	1
TNFAIP1	BF873449	Hs.76090	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	-0.0781	480	1
DOCK7	BF943497	Hs.406156	dedicator of cytokinesis 7	-0.0156	523	1

*apenas alguns genes com pvalor mais próximo de 0,05.

Tabela 7 - Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão de acordo com o tipo histológico *.

Gene	Genbank	Unigene	Nome	Statistic	Pvalor
COL16A1	BQ329081	Hs.26208	collagen, type XVI, alpha 1	17.0143	0.0364
CTNND2	BF956195	Hs.436421	catenin (cadherin-associated protein), delta 2 (neural plakophilin-related arm-repeat protein)	14.2936	0.0569
GPR17	BF090569	Hs.46453	G protein-coupled receptor 17	11.324	0.1609
SYP	AW386757	Hs.75667	synaptophysin	1.2176	0.9997
DEPDC6	AW375857	Hs.87729	DEP domain containing 6	0.5348	0.9997
ARID1B	AW866577	Hs.436008	AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)	0.6761	0.9997
AREG	AW819771	Hs.270833	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	0.7206	0.9997
GRB7	BG009559	Hs.86859	growth factor receptor-bound protein 7	0.1186	0.9997
TLOC1	BF744399	Hs.158193	translocation protein 1	0.5797	0.9997
SMPD1	BF920775	Hs.77813	sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal (acid sphingomyelinase)	0.2607	0.9997
CBLB	BI044792	Hs.436986	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b	0.2259	0.9997
ANGPTL2	AW385297	Hs.8025	angiopoietin-like 2	1.2933	0.9997
KIAA0483	BE005796	Hs.64691	KIAA0483 protein	1.0171	0.9997
TNFAIP1	BF873449	Hs.76090	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	0.9486	0.9997
DOCK7	BF943497	Hs.406156	dedicator of cytokinesis 7	1.9114	0.9997
TMEM10	BF958613	Hs.12449	transmembrane protein 10	0.6703	0.9997
NANS	BE833238	Hs.274424	N-acetylneuraminic acid synthase (sialic acid synthase)	1.8376	0.9997
DCTN1	BF954536	Hs.74617	dynactin 1 (p150, glued homolog, Drosophila)	0.3027	0.9997
CA14	BF326181	Hs.192491	carbonic anhydrase XIV	0.6019	0.9997

*apenas alguns genes com pvalor mais próximo de 0,05.

5 DISCUSSÃO

A crescente incidência do melanoma em todo o mundo vem preocupando toda a comunidade científica envolvida no diagnóstico e tratamento desta modalidade de câncer. Quando diagnosticado precocemente e tratado de maneira adequada, o MC apresenta índices de cura elevados, mas na presença de doença metastática o prognóstico de sobrevida em 5 anos chega a atingir níveis muito baixos, em torno de 15%, já que tratamentos sistêmicos como quimioterapia e imunoterapia são muito pouco efetivos, assim como a radioterapia.

Os vários fatores prognósticos histopatológicos e clínicos envolvidos no melanoma já são bem conhecidos. A espessura de Breslow é o fator prognóstico isolado mais importante para o MC localizado, mas na presença de envolvimento linfonodal este passa a ser o fator prognóstico mais importante (BALCH et al. 2001 a e b; BALCH et al. 2004; HOMSI et al. 2005).

Em nossa casuística, onde 63 pacientes foram observados, o índice de Breslow mostrou importância ao ser relacionado com o número de mortes causadas pelo melanoma, confirmando sua importância no prognóstico do melanoma mesmo em uma população pequena.

Apesar de muitos fatores prognósticos já terem sido identificados, em muitas situações a evolução de determinado paciente ocorre de maneira

diferente da esperada, sugerindo que existam alterações moleculares envolvidas na progressão do melanoma. Indivíduos com melanomas muito semelhantes podem ter evolução clínica muito diferente, sem justificativa para tal. Deste modo, a procura de novos fatores prognósticos e marcadores da doença que possam prever sua evolução ou mesmo sua resposta a determinado tipo de terapêutica torna-se muito significativo dentro do estudo científico do melanoma.

O melanoma é uma neoplasia cuja progressão ocorre através de estágios bem definidos, com características clínicas e histológicas bem definidas (CLARK et al. 1984), mas o fato dos mecanismos moleculares envolvidos nesta progressão ainda permanecerem obscuros tem explicado o baixo índice de sucesso no tratamento da doença metastática. Segundo GYORFFY et al. (2006), para o desenvolvimento de tratamentos efetivos para doença avançada e para aumento da sobrevida é absolutamente necessário que se entendam as alterações genéticas que levam a cada passo na progressão do melanoma.

Concordamos integralmente com NAMBIAR et al. (2005) quando colocam que uma visão geral do transcriptoma, ou seja, do perfil de expressão gênica do indivíduo, pode definir a nível molecular os fenótipos clínicos e histopatológicos de determinado tumor. A literatura mundial também tem a mesma opinião, visto que vários estudos no âmbito da biologia molecular vêm sendo realizados na tentativa de determinar estes mecanismos moleculares associados com a evolução do melanoma (BITTNER et al. 2000; WANG et al.

2002; CARR et al. 2003; ALONSO et al. 2004; BALDI et al. 2003a e b; HOEK et al. 2004; PAVEY et al. 2004; MIRMOHAMMADSADEGH et al. 2004; DE WIT et al. 2005; KARST et al. 2005; BUSM et al. 2005; TALANTOV et al. 2005; HAQQ et al. 2005; OKAMOTO et al. 2005; WINNEPENNINCKX et al. 2006, GYORFFY et al. 2006).

A maior parte destes estudos vem utilizando linhagens celulares de melanoma ou amostras de tecidos metastáticos. Estudos da expressão gênica de pacientes com material obtido de melanomas primários associados com a evolução clínica ou comparados com lesões benignas são difíceis de serem realizados devido às limitações relacionadas com a obtenção de material da própria lesão primária. TALANTOV et al. (2005) e WINNEPENNINCKX et al. (2006) foram os que conseguiram reunir o maior número de lesões primárias. Em nosso estudo, após praticamente 3 anos de coleta de tumores primários, várias amostras tiveram que ser descartadas por apresentarem muita necrose ou pouco tumor, inviabilizando a coleta do RNA. Das 65 lesões primárias analisadas inicialmente, 42 tiveram que ser descartadas por estes problemas. Como o número de pacientes que chega ao hospital com a lesão primária presente também não é grande, só conseguimos validar 20 lesões primárias. Além disso, frente a uma lesão primária, todo o cuidado deve ser tomado para que não haja prejuízo em relação ao diagnóstico histopatológico, diagnóstico este que irá ditar o tratamento do paciente. Para melhor orientação do local a ser realizada a retirada do material para extração do RNA sem prejuízo ao resultado histopatológico, utilizamos a dermatoscopia para procurar a área de

menor profundidade da lesão tumoral (REZZE et al. 2006). Por todas estas dificuldades na obtenção de material da lesão primária, conclui-se que para estudos de melanoma com número grandes de amostras, há necessidade de estudos multicêntricos.

O material obtido do banco de tumores do Hospital do Câncer A. C. Camargo de São Paulo possibilitou um aumento significativo de nossa casuística, principalmente em relação aos tumores metastáticos. O estudo da expressão gênica de lesões primárias e metastáticas pode ser feita conjuntamente, pois não apresentam diferenças significativas. Isto foi observado por RAMASWAMY et al. (2003) e WINNEPENNINCKX et al. (2006). Os primeiros analisaram a expressão gênica de 9 tumores primários e suas metástases e não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre elas, enquanto que o outro grupo, estudando lesões primárias e metastáticas de adenocarcinomas, encontrou uma grande parte de assinaturas de expressão gênica semelhante entre os dois tipos de lesão. CARR et al. (2003), baseando-se em estudos de WANG et al. (2002) com melanomas metastáticos e de PEROU et al. (2000) com câncer mamário, colocam que o fato do perfil de expressão de genes de lesões primárias serem semelhantes às lesões metastáticas é muito importante para poder diminuir a limitação de material disponível para estudo.

Os maiores estudos da literatura objetivando identificar genes associados ao desenvolvimento do melanoma utilizaram tecnologia de *microarrays* ou SAGE (BALDI et al. 2003a; HOEK et al. 2004; TALANTOV et al. 2005;

NAMBIAR et al. 2005; DE WIT et al. 2005). A tecnologia do microarray veio proporcionar a análise da expressão de milhares de genes simultaneamente, tornando-se uma ferramenta importante para investigar processos biológicos através da análise de genes em grande escala a partir de uma célula em particular ou mesmo de determinado tecido biológico ou organismo (SCHENA et al. 1995; DUGGAN et al. 1999; AITMAN 2001; BALDI et al. 2003a e b; BOWDEN e BRENNAN 2004; KUNZ et al. 2004; SELLHEYER e BELBIN 2004). Em nosso estudo optamos por utilizar o cDNA microarray. Esta parte do trabalho foi desenvolvida pela doutoranda Waleska Keller Martins que utilizou os mesmos dados para sua tese que está sendo desenvolvida simultaneamente. Desta maneira, os projetos caminharam conjuntamente, sendo a parte clínica de nossa responsabilidade. Nossa expectativa ao conseguir medir milhares de genes em um grande número de espécimes clínicas é a de que se revelaria uma descrição molecular detalhada do melanoma.

Diferentemente do nosso estudo, estes estudos referidos no parágrafo anterior, compararam o perfil de expressão gênica dos melanomas com lesões benignas como nevos ou mesmo com melanócitos normais. Nós comparamos grupos de pacientes com melanoma entre si, separando-os de acordo com seu prognóstico e evolução clínica.

A classificação do prognóstico destes pacientes foi feita baseando-se no modelo proposto por SOONG et al. (2003) após coleta de dados de aproximadamente 17600 pacientes obtidos de estudo multicêntrico de caráter

mundial. Este modelo prevê a chance de determinado paciente com melanoma estar vivo após 5 e 10 anos de acordo com algumas características histopatológicas do tumor primário e clínicas do paciente (índice de Breslow, ulceração, idade, localização do primário e nível de Clark para lesões finas). A determinação dos limites para considerarmos um paciente com prognóstico bom ou ruim não se encontra no entanto neste modelo nem na literatura. Devido à necessidade de uma classificação, optamos por colocar como limite de bom prognóstico a sobrevida acima de 60% em cinco anos.

A classificação da evolução clínica dos pacientes também teve que ser feita adotando-se algum critério objetivo. Assim, consideramos como 5 anos de sobrevida o limite inferior para uma boa evolução. Para os pacientes vivos com seguimento inferior a 5 anos foram considerados como tendo boa evolução na eventualidade de estarem sem doença. Na presença de doença, foram considerados como má evolução se o aparecimento da metástase tenha acontecido nos 2 primeiros anos de seguimento. Apesar do seguimento médio de 48 meses com uma mediana de 39 meses, o fato de alguns pacientes terem um seguimento curto pode prejudicar um pouco algumas análises, já que o evento metástase ou óbito ainda pode acontecer antes dos limites colocados por nós. Entre os 21 pacientes vivos, o menor seguimento é de 12 meses, enquanto que o maior seguimento é de 145 meses, com uma média de 53,3 meses. Apenas 3 pacientes foram acompanhados por menos de 24 meses (2 anos). Desta maneira, acreditamos que os dados gerados por estes pacientes

tenham sua validade e devam ser aproveitados neste e em qualquer estudo futuro.

O trabalho de WINNEPENNINCKX et al. (2006) é o que mais se aproxima do nosso. Compara, como nós, o perfil de expressão de genes em melanoma com a evolução clínica dos pacientes. Utilizando lesões primárias de melanoma conservadas congeladas e através de oligonucleotideo microarray, encontrou 2 clusters principais de tumores e ao compará-los identificou 254 genes associados com menor sobrevida livre de doença. O tempo livre de doença abaixo de 4 anos foi o parâmetro escolhido por esta autora para determinação de um pior prognóstico.

A criação de um banco de dados com todas características histopatológicas e clínicas dos pacientes com melanoma é que possibilitou a realização de nosso estudo e permitirá ainda futuros estudos. Seguindo o protocolo desenvolvido pelo Grupo Brasileiro de Melanoma e adaptado pelo departamento de Oncologia Cutânea do Hospital do Câncer A. C. Camargo de São Paulo (BRECHTBUHL et al. 2003), conseguimos reunir praticamente todos os dados envolvidos com o melanoma para cada paciente.

Inicialmente os dados pessoais e histórico pessoal e familiar foram anotados, dando-se ênfase às características fenotípicas dos pacientes (número de nevos, cor da pele, cor dos olhos, cor dos cabelos) e aos hábitos como quantidade e qualidade da exposição solar. Todos estes fatores são relacionados com o aumento do risco de desenvolvimento de melanoma (BARNHILL e MIHM 1998; CHUDNOVSKY et al. 2005). A seguir os dados

clínicos da lesão primária como tamanho, localização, ulceração e regressão clínica também foram observados. Em relação às características histopatológicas da lesão primária, sempre que possível a lâmina foi revisada pelo Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo de São Paulo. As diversas etapas do tratamento cirúrgico, envolvendo necessidade de linfadenectomias ou mesmo tratamentos adjuvantes também foram assinaladas. Após a realização do tratamento os pacientes foram seguidos clinicamente de acordo com o estabelecido na metodologia do trabalho, sendo assinaladas todas alterações relacionadas ao desenvolvimento do melanoma.

Com todos os dados relativos à história pessoal e familiar do paciente, as características do tumor, o tratamento instituído e a evolução de cada paciente, obtivemos um banco de dados com 63 pacientes, todos com seu material gênico também guardado. Nosso objetivo foi então o de utilizar este banco de dados para comparar dados clínicos com o perfil de expressão gênica de cada paciente.

Para análise dos dados obtidos por microarray, a abordagem matemática e estatística tem sido amplamente discutida na literatura e utilizada com sucesso por vários autores (GOMES et al. 2003, 2005; MEIRELES et al. 2003, 2004). Diversos cuidados devem ser considerados na elaboração, análise e interpretação dos resultados de experimentos de microarray, principalmente em relação ao número de experimentos e a forma de expressar os resultados (QUACKENBUSH 2001). Em nosso estudo, os dados foram analisados através

do teste estatístico ANOVA, baseado no cálculo da variância das médias para cada gene.

Inicialmente observando-se e comparando-se o perfil de expressão gênica dos pacientes com bom prognóstico que apresentaram evolução boa e ruim, não foram encontrados genes com significância estatística, o mesmo acontecendo na comparação entre os pacientes com boa evolução mas que tinham prognóstico bom e ruim. No entanto, fazendo-se a interação entre os dois testes, encontramos 2 genes diferencialmente expressos com significância estatística, mesmo após a correção por FDR. Os genes encontrados foram o AP3B2 (adapter related protein complex 3, beta 2 subunit), com valores negativos, e o UGCGL2 (UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 2), com valores positivos.

O termo de interação pode ser interpretado como a diferença entre os genes alterados no grupo com má evolução e os genes alterados no grupo boa evolução. Desta maneira, valores positivos se referem a genes superexpressos no grupo má evolução e valores negativos a genes mais expressos no grupo com boa evolução.

Descrito por SIMPSON et al. (1997), o complexo AP3 (adapter related protein complex) parece estar envolvido no transporte de proteínas através de lisossomos e no processo de distribuição citoplasmática, não estando relacionado às fases iniciais da tumorigênese. No entanto, uma alteração da compartimentalização de proteínas nos lisossomos poderia eventualmente favorecer o processo de disseminação por aumentar a expressão de

glicoproteínas na superfície da célula tumoral. A superexpressão deste gene no grupo com má evolução poderia de alguma maneira ser justificada por tal informação.

O gene UGCGL2 está relacionado com a biossíntese de glicoesfingolipídeos, essenciais para a função neuronal (JENNEMANN et al. 2005). Desta maneira, alterações neste gene podem levar as alterações neuronais após o nascimento. Apresenta também uma atividade semelhante a da enzima UDP-glucose ceramide glucosyltransferase que adiciona um resíduo de glucose a ceramida, primeiro passo na síntese dos glicoesfingolipídeos, como por exemplo os gangliosídeos. Os gangliosídeos estão envolvidos no crescimento e diferenciação celular, sendo marcadores da progressão de melanomas e têm inclusive propriedades imunossupressoras (PEGUET-NAVARRO et al. 2003; STRUCKHOFF et al. 2004; BENNACEUR et al. 2006).

Existem inclusive evidências de que gangliosídeos de melanoma humano prejudicam a diferenciação de células dendríticas da epiderme e induzindo-as a apoptose (PEGUET-NAVARRO et al. 2003). As células dendríticas são importantes apresentadoras de antígenos, críticas para a resposta imune celular.

Outros dados sugerem que a manipulação clínica dos níveis de ceramida, alterando portanto os níveis de gangliosídeos dentro dos tumores, representam um importante mecanismo para diminuir a sobrevivência do tumor e mecanismos de resistência aos quimioterápicos, portanto um grande alvo para o desenvolvimento de novas drogas.

No entanto, diferentemente do esperado, a expressão de UGCGL2 foi maior no grupo com boa evolução, justificado pelo valor negativo encontrado na análise. Mesmo assim, acreditamos que se trata de informação importante que deva ser melhor estudado.

Também analisamos e comparamos o perfil de expressão de genes dividindo os pacientes de acordo com alguns fatores relacionado com o prognóstico do melanoma, na tentativa de encontrar algum gene mais ou menos expresso que pudesse justificar o comportamento de determinada variável.

Em relação ao sexo, entre todos os genes avaliados, o gene JARID1D (RBP2 like) foi encontrado mais expresso no sexo masculino, diferença esta que se comportou com significância estatística. O gene do retinoblastoma é considerado como supressor de tumor, estando mutado em vários tipos de câncer mas surpreendentemente parece não ser afetado no melanoma. No entanto, a atividade da proteína Rb está inativada em melanomas devido à hiperfosforilação por CDK4 e CDK2, que são considerados oncogenes e já foram inclusive relacionados ao melanoma familiar. RBP2 (retinoblastoma binding protein 2), que se liga a complexos pRb-E2F, são reguladas por inibidores de CDK e portanto podem ser considerados supressores de tumor. (HALACHMI et al. 2001; HALABAN 2004; ROESCH et al. 2006). ROESCH et al. (2005) encontrou diminuição de RBP2 em tumores melanocíticos, diminuição esta que parece estar relacionada com a espessura e progressão tumoral. Apesar do sexo ser um fator de prognóstico independente nos melanomas

estádio I e II, o papel do sexo em pacientes com estágio IV não é totalmente claro, mas parece que nesta situação as mulheres apresentam melhor evolução que os homens (GERSHENWALD et al. 2003). A maior expressão de um gene com atuação semelhante a RBP2 deveria proporcionar a meu ver, um melhor prognóstico. Com um número maior de casos, poderemos dividir os pacientes de cada sexo de acordo com sua evolução e nessa situação analisar melhor a importância deste gene.

Analisando-se expressão de genes de acordo com o tipo histológico do tumor primário encontramos como diferencialmente expresso o gene o Col 16A1 (collagen, type XVI, alpha 1), que foi descrito por PAN em 1992 como um novo tipo de colágeno. Se localiza no braço curto do cromossomo 1 e parece apresentar alguma função na epiderme, mais precisamente nos queratinócitos. O estudo estatístico utilizado não permitiu no entanto diferenciar em qual tipo histológico este gene foi encontrado diferencialmente expresso. No entanto, nos parece um gene que mereça ser melhor estudado, pois DE WIT et al. (2005) encontrou 25 genes provavelmente envolvidos na progressão tumoral do melanoma, entre eles o Col 16A1.

A importância da classificação do melanoma em relação ao seu tipo histológico tem sido muito discutida, já que alguns autores duvidam de seu valor prognóstico isoladamente (BARNHILL e MIHM 1998) e sugerem que esta classificação seja feita de acordo com a localização do tumor primário e tipo de exposição à radiação ultravioleta. No ano de 2005, CURTIN et al. estudaram 4 grupos de melanomas de acordo com sua localização e o grau de exposição

solar e identificaram diferentes padrões genéticos, podendo inclusive prever algumas estratégias terapêuticas. O grupo de tumores localizados em áreas sem exposição crônica à radiação solar, freqüentemente apresentavam mutação em BRAF junto com perda em PTEN ou mutação em N-RAS somente. Nestes casos, poderia haver uma resposta terapêutica objetivando-se RAS-RAF-ERK. De modo contrário, nos outros 3 grupos estudados por este grupo (mucosa, acral e pele com exposição solar), não foram encontradas alterações em BRAF ou N-RAS mas um aumento de CCND1 ou CDK4. Estes pacientes provavelmente não responderiam ao tratamento sugerido para o primeiro grupo.

Analizando o perfil de expressão de genes dos nossos pacientes dividindo-os de acordo com outras variáveis como localização do tumor primário, índice mitótico, presença de regressão e ulceração, não encontramos genes diferencialmente expressos com significância estatística nestes grupos.

Em relação ao tipo de metástase a distância apresentada pelos 33 pacientes que evoluíram para estadió IV, também foi tentado fazer uma análise de expressão de genes de acordo com o local atingido. Pelo fato dos pacientes evoluírem algumas vezes com vários sítios de metástases concomitantes, este estudo não foi conclusivo pois o número de pacientes em cada subgrupo foi muito pequeno. O que nos chama a atenção é o pequeno número de casos com metástases hepáticas encontrado em nossa casuística, visto que a literatura mostra o fígado como o 3º sítio mais freqüente, depois da pele e subcutâneo e pulmão (HWU et al. 2003).

Os genes normalmente relacionados com o aumento de risco de melanoma como MC1R (melanocortin-1 receptor), P16, CDK4, PTEN, TP53 e RAS ainda não foram relatados como marcadores prognósticos (DU et al. 2004; DE SNOO e HAYWARD 2005). Também não foram por nós encontrados diferencialmente expressos, uma vez que em nosso estudo fizemos uma comparação entre grupos de melanomas entre si, e não com um controle que não fosse melanoma. Desta forma, nossos resultados mostram os genes que poderiam justificar uma evolução clínica diferente da esperada, se comportando desta maneira como um marcador de bom ou mau prognóstico.

BOSSERHOFF (2006) coloca que o melanoma é uma doença complexa determinada por vários mecanismos que afetam o crescimento, a diferenciação, a adesão e a sobrevivência celular. Após grande revisão de literatura sugere alguns marcadores moleculares para o prognóstico do melanoma. O AKT (protein Kinase B), uma quinase que estimula a proliferação celular e inibe a apoptose, seria um fator prognóstico independente em melanomas de baixo risco. Fatores angiogênicos estariam associados a maior espessura tumoral e conseqüentemente menor sobrevivência. A diminuição de Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor 1) nos melanomas poderia explicar em parte a falha encontrada no mecanismo de apoptose vista nesta neoplasia. Bcl-2 é outro gene envolvido na proliferação celular e sua menor expressão parece sugerir um aumento no potencial metastático da lesão. COX-2 é um enzima envolvida na produção de prostaglandinas em processos inflamatórios, mas tem sido encontrada em altos níveis em lesões metastáticas de vários tipos de câncer,

sugerindo sua participação também em lesões metastáticas de melanoma. HIF (hypoxia inducible factor) está relacionado ao crescimento tumoral, ativando angiogênese, glicólise e migração celular, portanto sua maior expressão encontrada em melanomas têm sido relacionado à um pior prognóstico. MITF (microphthalmia associated factor) parece ser importante para a sobrevivência de melanócitos malignos, tendo sido inclusive sugerido como um marcador prognóstico já que sua menor expressão se relacionou com um aumento na sobrevida e tempo livre de doença.

No entanto, nenhum dos novos marcadores moleculares se mostraram superior à classificação histológica convencional. Até o momento, o índice de Breslow e a presença de ulceração representam os fatores com maior significância de prognóstico. Acreditamos, no entanto, que marcadores biológicos devem ser estabelecidos para que alguns problemas importantes sejam estudados: a) a diferenciação entre nevo, nevo atípico e melanoma; b) a definição de prognóstico para os pacientes de alto risco e: c) a procura para a melhor opção terapêutica.

Apesar de não termos encontrado grande correlação entre a evolução clínica e o perfil de expressão de genes em pacientes com MC, acreditamos que este estudo tenha sido de grande importância pois pôde estabelecer um banco de dados que acrescido de maior número de casos e maior seguimento clínico, poderá contribuir para estudos futuros e abrir novas perspectivas na compreensão do melanoma cutâneo.

6 CONCLUSÕES

A partir do estudo realizado, pudemos concluir que:

- 1 Foi possível a criação de um banco de dados de melanomas com 63 pacientes. Neste banco estão arrolados dados clínicos dos pacientes, histopatológicos do tumor, dados do tratamento instituído, dados da evolução clínica e por fim, dados moleculares obtidos através da extração do RNA das amostras tumorais;
- 2 A correlação entre a evolução clínica e os dados moleculares encontrados (perfil de expressão gênica), possibilitou os seguintes achados:
 - a. O gene UGCGL2 foi encontrado mais expresso significativamente no grupo de pacientes com boa evolução;
 - b. O gene AP3B2 foi encontrado mais expresso significativamente no grupo de pacientes com má evolução;
 - c. O gene JARID1 foi encontrado mais expresso significativamente no sexo masculino;
 - d. O gene Col 16A1 encontrou-se diferencialmente expresso ao se levar em consideração a expressão gênica de acordo com o tipo histológico. No entanto, não foi possível identificar em qual tipo histológico houve maior expressão deste gene.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aitman TJ. DNA microarrays in medical practice. **Br Med J** 2001; 323:611-5.

Albino AP, Fountain JW. Molecular genetics of human malignant melanoma. In: Nathanson L, editor. **Current research and clinical management of melanoma**. Norwell, Mass: Kluwer Academic;1993. p.201.

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

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

Balch CM, Soong SJ, Milton GW, et al. A comparison of prognostic factors and surgical results in 1786 patients with localized (stage I) melanoma treated in Alabama, USA and New South Wales, Australia. **Ann Surg** 1982; 196:677-84.

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

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al. Prognostic factors analysis of 17600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on cancer melanoma staging system. **J Clin Oncol** 2001b; 19:3622-34.

Balch CM, Soong SJ, Atkins MB, et al. An evidence-based tagging system for cutaneous melanoma. **CA Cancer J Clin** 2004; 54:131-49.

Baldi A, Battista T, Luca AD, et al. Identification of genes down regulated during melanoma progression: a cDNA array study. **Exp Dermatol** 2003a; 12:213-8.

Baldi A, Santini D, De Luca A, Paggi MC. cDNA array technology in melanoma: an overview. **J Cell Physiol.** 2003b; 196:219-23.

Ball CA, Chen Y, Panavally S, et al. An introduction to microarrays bioinformatics. In: Bowtell D, Sambrook J, editors. **DNA microarrays: a molecular cloning manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003. p.509-94.

Barnhill RL, Mihm MC. Primary melanoma, histopathology and precursor lesions. In: Balch MC, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ, editors. **Cutaneous melanoma**. 3rd ed. St. Louis: Q. M. Publishing I.; 1998. p.103-33.

Bennaceur K, Popa I, Pourtokalian J, Berthier-Vergnes O, Peguet-Navarro J. Melanoma derived gangliosides impair migratory and antigen-presenting function of human epidermal Langerhans cells and induce their apoptosis. **Int Immunol** 2006; 18:879-86.

Bishop JAN. Molecular pathology of melanoma. **Cancer Metastasis Rev** 1997; 16: 141-54.

Bittner M, Meltzer P, Chen Y, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profile. **Nature** 2000; 406:536-40.

Bittner M, Butow R, Derisi J, et al. Expression analysis of RNA. In: Bowtell D, Sambrook J, editors. **DNA microarrays: a molecular cloning manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003. p.101-279.

Bosserhoff AK. Novel biomarkers in malignant melanoma. **Clin Chimica Acta** 2006; 367:28-35.

Bowden JR, Brennan PA. DNA microarray technology: insights for oral and maxillofacial surgeons. **Br J Maxillofac Surg** 2004; 42:542-45.

Brechtbuhl ER, Neves RI, Landman G, Maia M, Enokihara M. Manual de preenchimento e protocolo completo do registro brasileiro de melanoma (RBM). **Acta Oncol Bras** 2003; 23:472-83.

Busm KJ, Zhao H, Coit DG, et al. Distinction of desmoplastic melanoma by gene expression profile. **J Invest Dermatol** 2005; 124:412-9.

Carr KM, Bittner M, Trent JM. Gene-expression profiling in human cutaneous melanoma. **Oncogene** 2003; 22:3076-80.

Chandrasekharappa SC, Teh BT. Functional studies of the MEN1 gene. **J Intern Med** 2003; 253:606-15.

Chang CK, Jacobs IA, Vizgirda VM, et al. Melanoma in the elderly patient. **Arch Surg** 2003; 138:1135-38.

Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of racional therapeutics. **J Clin Invest** 2005; 115:813-24.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry, DT, et al. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum Pathol** 1984; 15:1147-55.

Clark WH Jr. Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer. **Cancer Metastasis Rev** 1991; 10:83-8.

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

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

de Snoo FA, Hayward NK. Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. **Cancer Lett** 2005; 230:153-86.

DeRisi J, Penland L, Brown PO, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. **Nat Genet** 1996; 14:457-60.

de Wit NJ, Rijntjes J, Diepstra JH, et al. Analysis of differential gene expression in human melanocytic tumour lesions by custom made oligonucleotide arrays. **Br J Cancer** 2005; 92:2249-61.

Du J, Widlund HR, Hortsman MA, et al. Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. **Cancer Cell** 2004; 6:565-76.

Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent J. Expression profiling using cDNA microarrays. **Nat Genet** 1999; 21:10-4.

Florell SR, Coffin CM, Holden JA, et al. Preservation of RNA for functional genomic studies: a multidisciplinary tumor bank protocol. **Mod Pathol** 2001; 14:116-28.

Fountain JW. Biologic and epidemiologic considerations, genetic factors. In: Balch MC, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ, editors. **Cutaneous melanoma**. 3rd ed. St. Louis: Q. M. Publishing I.; 1998. p.475-92.

Gershenwald JE, Balch CM, Soong S.J, Thompson JF. Prognostic factors and natural history. In: Balch MC, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ, editors. **Cutaneous melanoma**. 4th ed. St. Louis: Q. M. Publishing I.; 2003. p.25-54.

Gibbs P, Brady BMR, Robinson W.A. The genes and genetics of malignant melanoma. **J Cutan Med Surg** 2002; 6:229-35.

Gomes LI, Silva RLA, Stolf BS, et al. Comparative analysis of amplified and nonamplified RNA for hybridization in cDNA microarray. **Anal Biochem** 2003; 321:244-51.

Gomes LI, Esteves GH, Carvalho AF, et al. Expression profile of malignant and non-malignant lesions of esophagus and stomach: differential activity of functional modules related to inflammation and lipid metabolism. **Cancer Res** 2005; 65:7127-36.

Gyorffy B, Serra V, Materna V, et al. Analysis of gene expression profiles in melanoma cells with acquired resistance against antineoplastic drugs. **Mel Res** 2006; 16:147-55.

Halaban R. Rb/E2F: a two edged sword in the melanocytic system. **Cancer Metastasis Rev** 2005; 24:339-56.

Halachmi S, Gilchrest BA. Update on genetics events in the pathogenesis of melanoma. **Curr Opin Oncol** 2001; 13:129-36.

Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D, et al. The gene expression signatures of melanoma progression. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102:6092-7.

Helmke Bm, Polychronidis M, Benner A, Thome M, Arribas J, Deichmann M. Melanoma metastasis is associated with enhanced expression of syntenin gene. **Oncol Rep** 2004; 12:221-8.

Hoek K, Rimm DL, Williams KR, et al. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. **Cancer Res** 2004; 64:5270-82.

Homsy J, Kashani-Sabet M, Messina JL, Daud A. Cutaneous melanoma: prognostic factors. **Cancer Control** 2005;12:223-9.

Hussein MR. Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. **J Clin Pathol** 2004; 57:797-801.

Hwu WJ, Balch CM, Houghton AN. Diagnosis of stage IV disease. In: Balch MC, Houghton AN, Sober AJ, Sober SJ, editors. **Cutaneous melanoma**. 4th ed. St. Louis: Q. M. Publishing I.; 2003. p.523-46.

Jennemann R, Sandhoff R, Wang S, et al. Cell-specific deletion of glucosylceramide synthase in brains leads to neural defects after birth. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102:12459-64.

Karst AM, Dai DL, Martinka M, Li G. PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas. **Oncogene** 2005; 24:1111-6.

Kunz M, Ibrahim SM, Koczan D, Scheid S, Thiesen HJ, Gross G. DNA microarray technology and its applications in dermatology. **Exp Dermatol** 2004; 13:593-606.

Langley RGB, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Primary melanoma. clinical characteristics. In: Balch MC, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ, editors. **Cutaneous melanoma**. 3rd ed. St. Louis: Q. M. Publishing I.; 1998. p.81-101.

Lockhart DJ, Winzler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. **Nature** 2000; 405:827-36.

Martin K, Graner E, Price LM, et al. High sensitivity array analysis of gene expression for the early detection of disseminated breast tumor cells in peripheral blood. **Proc Nat Acad Sci USA** 2001; 98:2246-51.

Masback A, Olsson H, Westerdahl J, et al. Prognostic factors in invasive cutaneous malignant melanoma: a population-based study and review. **Melanoma Res** 2001; 11:435-45.

Meireles SI, Carvalho AF, Hirata R, et al. Differentially expressed genes in gastric tumors identified by cDNA array. **Cancer Lett** 2003; 190:199-211.

Meireles SI, Cristo EB, Carvalho AF, et al. Molecular classifiers for gastric cancer and nonmalignant diseases of the gastric mucosa. **Cancer Res** 2004; 64:1255-65.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2006 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Mirmohammadsadegh A, Baer A, Nambiar S, Bardenheuer W, Hengge UR. Rapid identification of dysregulated genes in cutaneous malignant melanoma metastases using cDNA technology. **Cells Tissue Organs** 2004; 177:119-23.

Nambiar S, Mirmohammadsadegh A, Doroudi R, et al. Signaling Networks in cutaneous melanoma metastases identified by complementary DNA microarray. **Arch Dermatol** 2005; 141:165-73.

Murphy GF, Mihm MC. The skin. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, editors. **Pathologic basis of disease**. 6th ed. Philadelphia: W.B Saunders; 1999. p.1170-213.

Ng KCP, Campos EI, Martinka M, Li G. XAF1 expression is significantly reduced in human melanoma. **J Invest Dermatol** 2004; 123:1127-34.

Okamoto I, Pirker C, Bilban M, et al. Seven novel and stable translocations associated with oncogenic gene expression in malignant melanoma. **Neoplasia** 2005; 4:303-11.

Pan TC, Zhang RZ, Mattei MG, Timpl R, Chu ML. Cloning and chromosomal location of human alpha1 (XVI) collagen. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992; 89:6565-9.

Pavey S, Johansson P, Packer L, et al. Microarray expression profiling in melanoma reveals a BRAF mutation signature. **Oncogene** 2004; 23:4060-67.

Peguet-Navarro J, Sportouch M, Popa I, Berthier O, Schmitt D, Portoukalin J. Gangliosides from human melanoma tumours impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. **J Immunol** 2003; 170:3488-94.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 406:747-52.

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

Pruitt KD, Tatusova, T, Maglott DR. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. **Nucleic Acids Res** 2005; 33:D501-D504

Quackenbush J. Weighing our measures of gene expression. **Mol Syst Biol** 2006; 2:63.

Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Gollub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumours. **Nat Genet** 2003; 33:49-55.

Rezze GG, Scramin AP, Neves RI, Landman G. Structural correlations between dermoscopic features of cutaneous melanoma and histopathology using transverse sections. **Am J Dermatol** 2006; 28:13-20.

Roesch A, Becker B, Meyer S, et al. Retinoblastoma-binding protein 2-homolog 1: a retinoblastoma-binding protein downregulated in malignant melanoma. **Mod Pathol** 2005; 18:1249-57.

Roesch A, Becker B, Schneider-Brachert W, Hagen I, Landthaler M, Vogt T. Re-expression of the retinoblastoma-binding protein 2-homolog 1 reveals tumour suppressive functions in highly metastatic melanoma cells. **J Invest Dermatol** 2006; 126:1850-9.

Rumpler G, Becker B, Hafner C, et al. Identification of differentially expressed genes in models of melanoma progression by cDNA array analysis: SPARC, MIF and a novel cathepsin protease characterize aggressive phenotypes. **Exp Dermatol** 2003; 12:761-77.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science** 1995; 270:467-70.

Sellheyer K, Belbin TJ. DNA microarrays: from structural genomics to functional genomics: the applications of gene chips in dermatology and dermatopathology. **J Am Acad Dermatol** 2004; 51:681-92.

Simpson F, Peden AA, Christopoulou L, Robinson MS. Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. **J Cell Biol** 1997; 137:835-45.

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

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

Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. **Stat Appl Genet Mol Biol** 2004; 3:Article3.

Soong SJ, Shaw HM, Balch CM, et al. Predicting survival and recurrence in localized melanoma: a multivariate approach. **World J Surg** 1992; 16:191-95.

Soong SJ, Zhang Y, Desmond RA. Models for predicting outcome. In: Balch MC, Houghton AN, Sober AJ, Soon SJ, editors. **Cutaneous melanoma**. 4th ed. St. Louis: Q. M. Publishing I.; 2003. p.77-90.

Stadelmann WK, Rapaport DP, Soon SJ, Reintgen DS, Buzaid AC, Balch MC. Predictive factors that influence melanoma outcome: prognostic, clinical and pathologic features. In: Balch MC, Houghton AN, Sober AJ, Soon SJ, editors. **Cutaneous melanoma**. 3rd ed. St. Louis: Q. M. Publishing I.; 1998. p.11-35.

Straume O, Sviland L, Asklen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. **Clin Cancer Res** 2000; 6:1845-53.

Struckhoff AP, Bittman R, Burow ME, et al. Novel ceramide analogs as potential chemotherapeutic agents in breast cancer. **J Pharmacol Exp Ther** 2004; 309:523-32.

Talantov D, Mazumder A, Yu JX, et al. Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions. **Clin Cancer Res** 2005; 11:7234-42.

Van de Vijver MJ, Yudong DH, et al. A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med** 2002; 347:1999-2009.

van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature** 2002; 415:530-36.

Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, et al. Prospective molecular profiling of melanoma metastases suggests classifiers of immune responsiveness. **Cancer Res** 2002; 62:3581-6.

Wheeler DL, Church DM, Federhen S, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology. **Nucleic Acids Res** 2003; 31:28-33.

Winnepenninckx V, Lazar V, Michiels S, et al. Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. **J Natl Cancer Inst** 2006; 98:472-82.

Zalaudek I, Ferrara G, Argenziano G, Ruocco V, Soyer P. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: a practical guide. **Skin Med** 2003; 2:20-31.

ANEXOS

Anexo 1 - Relação entre o índice de Breslow e o status de sobrevida na população estudada. P= 0,023.

Breslow em subgrupos	Status sobrevida		
	vivo	óbito	total
$\leq 1,0$ mm	5	2	7
1,01 – 2,0 mm	-	4	4
2,01 – 4,0 mm	8	4	12
> 4,0 mm	7	16	23
total	20	26	46

Anexo 2 - Relação entre a presença de ulceração e o status de sobrevida na população estudada. P= 0,233

Ulceração	Status sobrevida		
	vivo	óbito	Total
Sim	9	14	23
Não	10	8	18
total	19	22	41

Anexo 3 - Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão no grupo de pacientes abaixo de 60 anos de idade e acima de 60 anos de idade (apenas alguns genes com pvalor mais próximo de 0,05).

Gene	Genbank	Unigene	Nome	Fold	Statistic	Pvalor
CELSR1	BE093807	Hs.252387	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 (flamingo homolog, Drosophila)	-0.6605	208	0.1811
ZNF512	BE816271	Hs.294122	zinc finger protein 512	0.3188	770	0.1969
CML66	AW997233	Hs.195870	chronic myelogenous leukemia tumor antigen 66	0.2243	761	0.1969
HOXB13	BF855145	Hs.66731	homeo box B13	0.408	764	0.1969
MDH2	BF799421	Hs.405860	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	0.5125	761	0.1969
MDS025	AK055972	Hs.368866	hypothetical protein MDS025	0.4178	765	0.1969
GFPT2	BE841311	Hs.30332	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	-0.8085	245	0.2207
YWHAH	AY007132	Hs.226755	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	-0.5642	244	0.2207
C7orf36	AW819974	Hs.83313	chromosome 7 open reading frame 36	0.584	747	0.2894
GCN5L2	BF090680	Hs.101067	GCN5 general control of amino-acid synthesis 5-like 2 (yeast)	0.5821	743	0.3234
C3orf1	BQ355515	Hs.210036	chromosome 3 open reading frame 1	0.3004	740	0.345
KIAA0892	BE841895	Hs.112751	KIAA0892	0.2558	729	0.446
C20orf44	BF155842	Hs.176950	chromosome 20 open reading frame 44	0.2074	731	0.446
PRDX6	BF840208	Hs.120	peroxiredoxin 6	0.4008	729	0.446
LRP2	BF087631	Hs.252938	low density lipoprotein-related protein 2	0.7853	730	0.446
DEPDC6	AW375857	Hs.87729	DEP domain containing 6	0.2857	723	0.4501

Anexo 4 - Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão de acordo com a localização do tumor primário (apenas alguns genes com pvalor mais próximo de 0,05).

Gene	Genbank	Unigene	Denominação	Statistic	Pvalor
SYP	AW386757	Hs.75667	synaptophysin	1.3254	0.9978
DEPDC6	AW375857	Hs.87729	DEP domain containing 6	0.4439	0.9978
ARID1B	AW866577	Hs.436008	AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)	0.1987	0.9978
AREG	AW819771	Hs.270833	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	0.2501	0.9978
GRB7	BG009559	Hs.86859	growth factor receptor-bound protein 7	0.239	0.9978
TLOC1	BF744399	Hs.158193	translocation protein 1	0.6149	0.9978
SMPD1	BF920775	Hs.77813	sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal (acid sphingomyelinase)	1.4234	0.9978
CBLB	BI044792	Hs.436986	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b	0.842	0.9978
ANGPTL2	AW385297	Hs.8025	angiopoietin-like 2	0.3616	0.9978
KIAA0483	BE005796	Hs.64691	KIAA0483 protein	0.7631	0.9978
TNFAIP1	BF873449	Hs.76090	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	0.0648	0.9978
DOCK7	BF943497	Hs.406156	dedicator of cytokinesis 7	1.8915	0.9978
TMEM10	BF958613	Hs.12449	transmembrane protein 10	0.8399	0.9978
NANS	BE833238	Hs.274424	N-acetylneuraminic acid synthase (sialic acid synthase)	2.4735	0.9978
DCTN1	BF954536	Hs.74617	dynactin 1 (p150, glued homolog, Drosophila)	0.6143	0.9978
CA14	BF326181	Hs.192491	carbonic anhydrase XIV	0.6632	0.9978
PECI	BE844239	Hs.15250	peroxisomal D3,D2-enoyl-CoA isomerase	0.6564	0.9978
SYPL	BF747501	Hs.80919	synaptophysin-like protein	0.7972	0.9978
SEC15L1	BE926764	Hs.272374	SEC15-like 1 (S. cerevisiae)	0.3755	0.9978
CLIC4	BE826039	Hs.25035	chloride intracellular channel 4	1.8116	0.9978

Anexo 5 - Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão de acordo com o índice mitótico (apenas alguns genes com pvalor mais próximo de 0,05).

Gene	Genbank	Unigene	Denominação	Statistic	Pvalor
DKFZP434L0117	BF768541	Hs.63795	hypothetical protein DKFZp434L0117	9.1157	0.7372
ZNF403	BE814894	Hs.149055	zinc finger protein 403	9.8558	0.7372
GRB7	BG009559	Hs.86859	growth factor receptor-bound protein 7	2.3312	0.8944
SYPL	BF747501	Hs.80919	synaptophysin-like protein	2.572	0.8944
CLIC4	BE826039	Hs.25035	chloride intracellular channel 4	1.9849	0.8944
KIAA0934	BF958233	Hs.116204	KIAA0934	4.1388	0.8944
HNRPH3	AW878310	Hs.156481	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9)	1.6985	0.8944
FSTL1	BI057629	Hs.433622	folliculin-like 1	2.2859	0.8944
SPTAN1	BE812324	Hs.387905	spectrin, alpha, non- erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	2.0417	0.8944
SLPI	BE184402	Hs.251754	secretory leukocyte protease inhibitor (antileukoproteinase)	2.7036	0.8944
ZFR	BE928089	Hs.173518	zinc finger RNA binding protein	2.612	0.8944
SQRD1	BE716219	Hs.435468	sulfide quinone reductase-like (yeast)	1.8422	0.8944
NTN4	BF822399	Hs.102541	netrin 4	1.725	0.8944
TRIM2	BF845020	Hs.435734	tripartite motif-containing 2	2.6397	0.8944
MYO1C	AW880953	Hs.286226	myosin IC	3.4926	0.8944
GRPEL1	BF888312	Hs.151903	GrpE-like 1, mitochondrial (E. coli)	3.2451	0.8944
GK001	AK027844	Hs.8207	GK001 protein	2.6581	0.8944
LAP1B	AK023204	Hs.234265	lamina-associated polypeptide 1B	3.1443	0.8944

Anexo 6 - Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão de acordo com o a presença ou não de regressão histológica (apenas alguns genes com pvalor mais próximo de 0,05).

Gene	Genbank	Unigene	Denominação	Fold	Statistic	Pvalor
ALDH2	AW821725	Hs.331141	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	0.2126	48	0.752
AXUD1	BF846203	Hs.6607	AXIN1 up-regulated 1	-0.4321	1	0.752
APPBP2	AW177569	Hs.84084	amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein 2	-0.3902	1	0.752
USP47	AW892703	Hs.441028	ubiquitin specific protease 47	-0.1709	1	0.752
BRIP1	BF799785	Hs.87507	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	0.2118	48	0.752
NOLC1	BI013186	Hs.75337	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	0.8373	47	0.752
DKFZP564G2022	AW370972	Hs.200692	DKFZP564G2022 protein	0.9178	48	0.752
LOC51035	BE694411	Hs.351296	ORF	-0.6069	1	0.752
FLJ23563	AW812215	Hs.274256	hypothetical protein FLJ23563	-0.2973	0	0.752
KIAA1463	AW800746	Hs.21104	KIAA1463 protein	0.7302	48	0.752
PSMB9	AW939036	Hs.381081	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional protease 2)	-1.221	1	0.752
PFDN2	BG945862	Hs.298229	prefoldin 2	0.3261	47	0.752

Anexo 7 - Análise da expressão de genes entre a diferença de expressão de acordo com a presença ou não de ulceração (apenas alguns genes com pvalor mais próximo de 0,05).

Gene	Genbank	Unigene	Denominação	Statistic	Pvalor
DKFZP434L0117	BF768541	Hs.63795	hypothetical protein DKFZp434L0117	9.1157	0.7372
ZNF403	BE814894	Hs.149055	zinc finger protein 403	9.8558	0.7372
GRB7	BG009559	Hs.86859	growth factor receptor-bound protein 7	2.3312	0.8944
SYPL	BF747501	Hs.80919	synaptophysin-like protein	2.572	0.8944
CLIC4	BE826039	Hs.25035	chloride intracellular channel 4	1.9849	0.8944
KIAA0934	BF958233	Hs.116204	KIAA0934	4.1388	0.8944
HNRPH3	AW878310	Hs.156481	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9)	1.6985	0.8944
FSTL1	BI057629	Hs.433622	folistatin-like 1	2.2859	0.8944
SPTAN1	BE812324	Hs.387905	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	2.0417	0.8944
SLPI	BE184402	Hs.251754	secretory leukocyte protease inhibitor (antileukoproteinase)	2.7036	0.8944
ZFR	BE928089	Hs.173518	zinc finger RNA binding protein	2.612	0.8944
SQRD	BE716219	Hs.435468	sulfide quinone reductase-like (yeast)	1.8422	0.8944
NTN4	BF822399	Hs.102541	netrin 4	1.725	0.8944
TRIM2	BF845020	Hs.435734	tripartite motif-containing 2	2.6397	0.8944
MYO1C	AW880953	Hs.286226	myosin IC	3.4926	0.8944
GRPEL1	BF888312	Hs.151903	GrpE-like 1, mitochondrial (E. coli)	3.2451	0.8944
GK001	AK027844	Hs.8207	GK001 protein	2.6581	0.8944
LAP1B	AK023204	Hs.234265	lamina-associated polypeptide 1B	3.1443	0.8944
DSC3	AK001100	Hs.41690	desmocollin 3	2.7343	0.8944
ANK2	BF942957	Hs.409783	ankyrin 2, neuronal	2.3572	0.8944

Anexo 8 - Termo de informação e consentimento



Termo de informação e consentimento

Para obter um maior conhecimento clínico e científico do câncer, o Corpo Clínico deste Hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica científica. Através desta pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento.

Você está sendo admitido (a) neste Hospital para estabelecimento de diagnóstico e/ou tratamento de alguma forma de tumor. Para fins de diagnóstico e/ou como parte de seu tratamento, há necessidade da remoção do tumor e/ou material biológico relacionado à enfermidade. É prática rotineira deste Hospital usar parte do tumor e/ou outro material biológico retirado, para exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo. O restante do tumor que é retirado, ou do material biológico, não é utilizado, sendo então armazenado para novos exames se necessário. Caso contrário, são descartados, conforme Legislação Sanitária regulamentar sobre o assunto.

Estamos realizando pesquisa com melanomas cutâneos para comparar a evolução clínica de pacientes submetidos a perfusão isolada de membro com seu perfil de expressão gênica. Para tal, antes da realização da perfusão, as lesões serão biopsiadas e o material encaminhado para realização do seu estudo molecular. O fragmento será identificado no laboratório por um código de números e letras, e, portanto, sua privacidade e identidade serão sempre preservadas. O procedimento cirúrgico será feito normalmente, sem qualquer alteração

em relação ao método já estabelecido e utilizado em vários centros de tratamento de melanoma no mundo. O acompanhamento pós-operatório será habitual e com frequência a cada 2 meses no primeiro ano.

A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com o uso do material para os fins acima descritos, é necessário esclarece-lo (a) que não existem quaisquer benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu tratamento.

Se o pesquisador principal não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor entre em contato com o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital do Câncer - SP pelo telefone 3272-5000, ramais 1113 ou 1117.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado no Departamento de Oncologia Cutanea deste hospital. Somente assine este Termo, se consentir.

DECLARAÇÃO

Declaro estar ciente das informações ora prestadas, tendo lido atentamente e concordado com todo o teor.

São Paulo,de.....de.....
.....

Responsável ou Paciente

Nome:

RG:

RGH:

Anexo 9 - Protocolo utilizado para a coleta de dados e seguimento dos pacientes

Protocolo de Melanoma Cutâneo	
Nome:	
Data de nascimento (usar 4 dígitos para ano): ____ / ____ / ____-____	
Endereço (p/ corresp.):	
Cidade:	Estado:
CEP: ____-____/____-____	Tel.: (0XX____) ____-____-____-____
Dados do Paciente	
Data do Preenchimento: (usar 4 dígitos para ano) ____ / ____ / ____-____	
Sexo: () masculino () feminino	
Cor: () B () A () Não Branco	
Profissão: () Grande exposição Solar () Sem grande exposição solar	
Pcte é residente na cidade acima citada: () sim () não → se <u>não</u> : Estado de origem:	
Naturalidade: () brasileira () estrangeira	
Fatores de Risco	
História Pessoal de melanoma cutâneo -----() sim () não	
História Pessoal de CBC ou CEC <u>de pele</u> () sim () não	
História Pessoal de outra neoplasia (excluindo CBC/CEC de pele) Se sim,	
História Familiar de CBC ou CEC de pele () sim	Se sim: () parente de 1º grau () parente de 2º grau ()
História Familiar de melanoma----- () sim	Se sim: () parente de 1º grau () parente de 2º grau ()
História Familiar de outra neoplasia interna---- () sim () não	Se sim, qual(is) órgão(s): _____
	Se sim: () parente de 1º grau () parente de 2º grau ()
Fototipo de pele I e II----- () sim () não	
Pele actínica----- () sim () não	
Olhos claros (verdes ou azuis) ----- () sim () não	
Cabelos claros (loiros ou ruivos)----- () sim () não	
Nevo melanocítico (NM) atípico (comprovado histopatologicamente) () sim () não	
NM congênito: () sim ()	se sim: () gigante [$>20\text{ cm}^2$] () médio () pequeno Relacionado ao mel. () sim ()
Nevo melanocítico múltiplo () sim () não	se sim: () <50 () >50
Queimadura solar (episódio marcante, com eritema e eventual/e bolhas) () infância () adulto () ambos	
Efélides na infância----- () sim () não	
Melanoma cutâneo relacionado com gravidez ----- () sim () não	

Cont/ Anexo 9

Dados do Tumor Primário			
Data do Diagnóstico (mês/ano): __./__./__.		É tumor Metacrônico ? () Sim () Não	
Idade ao diagnóstico Inicial: __. __. __ anos		(aparecimento de novos tumores primários em períodos diferentes)	
Tamanho da Lesão Primária (em mm, aspecto clínico da lesão presente)		__.__. __ X __.__. __ () sem informação	
		Maior Eixo(mm) Menor Eixo(mm)	
Localização da Lesão Primária (utilize a codificação da tabela abaixo – marque com um X no local correspondente)			
() T-02000 Não	() T-02153 Sulco	() T-02455 Região	() T-02609 Braço
() T-02101 Fronte D	() T-02164 Sulco naso-	() T-02456A Região	() T-02608 Braço
() T-02103 Fronte E	() T-02167 Região	() T-02458 Flanco	() T-02628
() G-00001 Couro	() T-02168 Região	() T-02459 Flanco	() T-02629
() G-00002 Couro	() G-00003 Região da	() T-02480	() T-02648 Mão D
() T-02116 Região pré-	() G-00004 Região da	() T-02472 Nádega	() T-02649 Mão E
() T-02117 Região pré-auricular E	() T-02309 Pescoço D	() T-02473 Nádega E	() T-02808 Coxa D
() T-02124 Região malar D	() T-02308 Pescoço E	() T-02474 Quadril D	() T-02809 Coxa E
() T-02125 Região malar E	() T-02415 Região escapular D	() T-02463 Quadril E	() T-02824 Perna D
() T-02128 Pálpebra D	() T-02416 Região escapular E	() T-02475 Sacral	() T-02825 Perna E
() T-02129 Pálpebra E	() T-02456 Reg. Interescapular	() T-02483 Umbigo	() T-02848 Pé D
() T-02140 Nariz	() T-02428 Mama D	() T-02489 Abdome D	() T-02849 Pé E
() T-02151 Lábio superior	() T-02429 Mama E	() T-02490 Abdome E	() G-00005 Orelha D
() T-02152 Lábio inferior	() T-02427 Reg. esternal	() G-00007 Abd. Médio inf.	() G-00006 Orelha E
() T-02155 Mento	() T-02454 Região dorsal D	() T-02500 Períneo	() G-00008 Localiz. Desc.
		() G-00009 Sub-ungueal, Periungueal	
Dados Clínicos do Tumor Atual			
Regressão clínica da Lesão Primária () sim () não () sem informação			

Cont/ Anexo 9

Ulceração clínica da Lesão Primária ☐ sim ☐ não ☐ sem informação	
Situação do Paciente na Admissão (clínica) – pode assinalar + de uma alternativa	
☐ TU primário não avaliável	
☐ TU primário avaliável → ☐ intacto ☐ inicial biopsiado	
☐ recidiva → se sim: ☐ local ☐ regional (linfonodal)	
☐ satelitose ou em trânsito	
☐ metástase locoregional (linfonodal)	
☐ metástase à distância → ☐ pele ☐ LN não regional ☐ pulmão ☐ cérebro ☐ fígado ☐ ossos ☐	
Histopatologia da Lesão Primária – preferencialmente da peça cirúrgica	
☐ Externo ao serviço que está comunicando → se sim: revisão de lâmina: ☐ sim ☐ não	
ano: __.__.__.__ N° exame: __.__.__.__.__.__.__.__	
☐ MÊS ☐ MN ☐ MAL ☐ LMM ☐ outros (lista)	
Fase de crescimento: ☐ vertical ☐ radial	☐ <i>in situ</i> → subtipo ☐ MÊS ☐ MAL ☐ LM ☐ não especificado
Breslow: __.__.__, __.__(em mm)	Nevo associado ao melanoma ☐ sim ☐ não
Clark: ☐ I (<i>in situ</i>) ☐ II ☐ III ☐ IV ☐ V	
Ulceração ☐ sim ☐ não	
Índice mitótico: __. __ / 10 CGA	
Invasão vascular / linfática: ☐ sim ☐ não	
Invasão perineural: ☐ sim ☐ não	
Infiltr. Inflam. peritumoral: ☐ sim ☐ não	
Infiltr. Inflam. intratumoral: ☐ sim ☐ não	
Área de regressão : ☐ sim ☐ não	
Nódulos satélites : ☐ sim ☐ não	
Margens: ☐ livres ☐ comprometidas	

Cont/ Anexo 9

Terapêutica			
Tratamento cirúrgico do tumor primário			
Data da 1ª cirurgia: __. __ / __. __ / __. __. __. __		() nesta Instituição () em outro serviço	
☐ biópsia incisional ☐ biópsia excisional (até 2mm) ☐ desconhecida ☐ margens insuficientes ☐ margens suficientes		Margens cirúrgicas (em cm): __. __ , __. __	
Data da 2ª cirurgia: __. __ / __. __ / __. __. __. __		() nesta Instituição () em outro serviço	
☐ ressecção completa com margem ☐ ampliação após excisão prévia		Margens cirúrgicas (em cm): __. __ , __. __	
Tratamento Locoregional			
Se LN clinicamente negativos			
Pesquisa do LN sentinela () sim () não Data __. __ / __. __ / __. __. __. __			
() Corante vital () Gama Probe () ambos			
Quantidade de bases de drenagem linfática preferências encontrados na linfocintigrafia: () 1 () 2 () 3 () 4 () 5			
Axilar D	() não	() explorado __/ __ (LNS	N.º de LNS marcados na linfocintilografia→
Axilar E	() não	() explorado __/ __ (LNS	N.º de LNS marcados na linfocintilografia→
Epitroclea	() não	() explorado __/ __ (LNS	N.º de LNS marcados na linfocintilografia→
Epitroclea	() não	() explorado __/ __ (LNS	N.º de LNS marcados na linfocintilografia→
Cervical	() não	() explorado __/ __ (LNS	N.º de LNS marcados na linfocintilografia→
Cervical	() não	() explorado __/ __ (LNS	N.º de LNS marcados na linfocintilografia→
Inguinal	() não	() explorado __/ __ (LNS	N.º de LNS marcados na linfocintilografia→
Inguinal	() não	() explorado __/ __ (LNS	N.º de LNS marcados na linfocintilografia→
Íliaco D	() não	() explorado __/ __ (LNS	N.º de LNS marcados na linfocintilografia→
Íliaco E	() não	() explorado __/ __ (LNS	N.º de LNS marcados na linfocintilografia→
Poplíteo	() não	() explorado __/ __ (LNS	N.º de LNS marcados na linfocintilografia→
Poplíteo	() não	() explorado __/ __ (LNS	N.º de LNS marcados na linfocintilografia→
_____	() não	() explorado __/ __ (LNS	N.º de LNS marcados na linfocintilografia→
_____	() não	() explorado __/ __ (LNS	N.º de LNS marcados na linfocintilografia→
Anatomia patológica do LNS <u>positivo</u>			
LNS local _____	1: () HE+	Imuno () realizada () não realiz. () S100+ () HMB45+ () MelanA+ () _____+	

Cont/Anexo 9

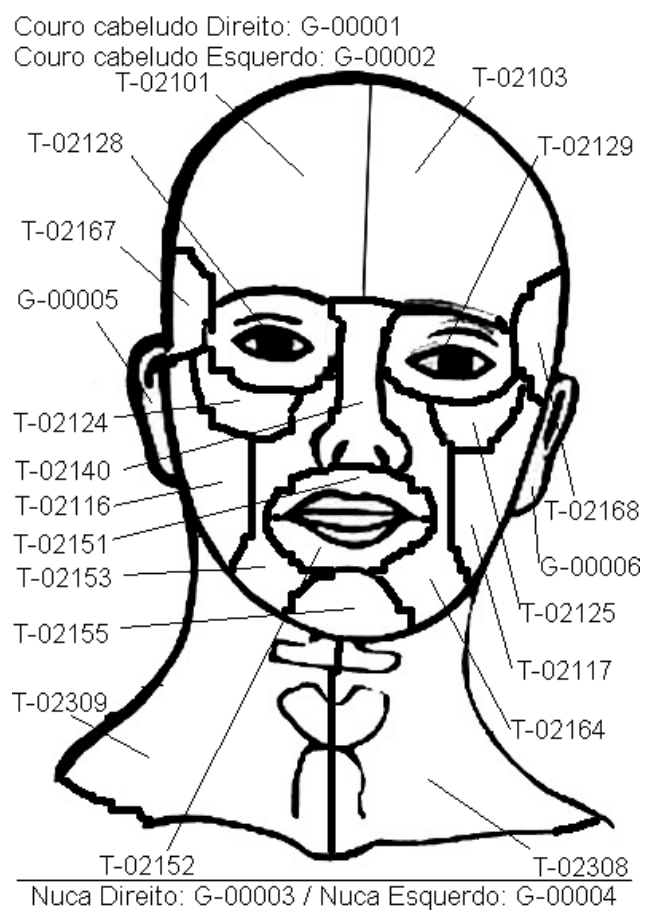
LNS 2: local_____	()HE+	Imuno ()realizada ()não realiz. ()S100+ ()HMB45+ ()MelanA+ () _____+
LNS 3: local_____	()HE+	Imuno ()realizada ()não realiz. ()S100+ ()HMB45+ ()MelanA+ () _____+
LNS 4: local_____	()HE+	Imuno ()realizada ()não realiz. ()S100+ ()HMB45+ ()MelanA+ () _____+
LNS 5: local_____	()HE+	Imuno ()realizada ()não realiz. ()S100+ ()HMB45+ ()MelanA+ () _____+
Linfadenectomia se: ()LN clinicamente positivos ()LNS positivo ()Eletiva Data __/__/____		
Axilar D	____/____	(LN patológico não sentinela/ total de LN da linfadenectomia)
Axilar E	____/____	(LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Epitroclear D	____/____	(LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Epitroclear E	____/____	(LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Cervical D	____/____	(LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Cervical E	____/____	(LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Inguinal D	____/____	(LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Inguinal E	____/____	(LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Ilíaco D	____/____	(LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Ilíaco E	____/____	(LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Poplíteo D	____/____	(LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)
Poplíteo E	____/____	(LN patológico não sentinela / total de LN da linfadenectomia)

Cont/Anexo 9

Outra localiz. _____ / _____ (LN patológico não sentinela / total de LN da D linfadenectomia)	
Outra localiz. _____ / _____ (LN patológico não sentinela / total de LN da E linfadenectomia)	
Se estágio IV: ()DHL normal ()DHL aumentada	
Estadiamento Final - AJCC Ano: 2002	
TNM	T ()T0 ()Tx ()Tis ()T1a ()T1b ()T2a ()T2b ()T3a ()T3b ()T4a ()T4b
	N ()N0 ()Nx ()N1a ()N1b ()N2a ()N2b ()N2c ()N3
	M ()M0 ()Mx ()M1a ()M1b ()M1c – DHL normal ()M1c – DHL aumentada
Estádio ()0 ()IA ()IB ()IIA ()IIB ()IIC ()IIIA ()IIIB ()IIIC ()IV(M1a) ()IV(M1b) ()IV(M1c- DHL normal) ()IV(M1c- DHL aumentada)	
Tratamento Neoadjuvante, Adjuvante ou Terapêutico	
Tratamento Neoadjuvante	()bioQT ()QT ()RT ()outro: _____

Tratamento Adjuvante	()bioQT ()QT ()RT ()vacina autóloga ()vacina peptídeo ()IFN ()outro: _____
Terapêutico	()bioQT ()QT ()RT ()vacina autóloga ()vacina peptídeo ()perfusão ()infusão ()imunoterapia intralesional ()LASER CO2 ()outro: _____
Intervalo Livre de Doença	
Recidiva: () local () locorregional (trânsito ou linfonodal) Data ____/____/____	
Primeira alteração de estágio Data ____/____/____ estádio: ()IIIA ()IIIB ()IIC ()IV(M1a) ()IV(M1b) ()IV(M1c- DHL normal) ()IV(M1c- DHL aumentada)	
Segunda alteração de estágio Data ____/____/____ estádio: ()IV(M1a) ()IV(M1b) ()IV(M1c- DHL normal) ()IV(M1c- DHL aumentada)	
Status do Paciente na última avaliação: data ____/____/____ ()vivo sem doença ()morto por melanoma cutâneo ()morto por causa ignorada ()vivo com doença ()morto por outra causa ()sem informação	

Cont/ Anexo 9



Cont/ Anexo 9

Obs: a área anatômica mediana do esquema abaixo mede 5,0 cm de largura

