

**MELANOMA ACRAL-LENTIGINOSO: ANALISE DE
PROTEÍNAS E GENES DO CICLO CELULAR NAS
VIAS DE SINALIZAÇÃO p16/pRb, p53 e PTEN**

DÉCIO DE NATALE CALY

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Gilles Landman

Co-orientador: Dr^a. Renata de Almeida Coudry

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Caly, Décio de Natale

Melanoma acral-lentiginoso: análise de proteínas e genes do ciclo celular nas vias de sinalização p16/pRb, p53 e PTEN / Décio de Natale Caly - São Paulo, 2010.

63p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Gilles Landman

Descritores: 1. MELANOMA MALÍGNO. 2. IMUNO-HISTOQUÍMICA. 3. GENES P16. 4. GENES P53. PROTEÍNA DE PROTO-ONCOGENE AKT.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria Aparecida e Paulo, responsáveis por serem o exemplo e as bases de minha formação profissional, ética e moral, com gratidão pelos momentos de apoio, suporte, carinho e compreensão nesta jornada, a qual não seria possível sem eles.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Gilles Landman, meu orientador, por me guiar, orientar e pela amizade durante esta jornada.

Dr^a Renata de Almeida Coudry, pelos ensinamentos , atenção dispensada e amizade.

Ao Dr. José Humberto Tavares Fregnani, estatístico do Hospital do Câncer de Barretos, pela ajuda na análise estatística do projeto.

Prof. Dr. Martin Sanguenza, médico dermatologista do Hospital Obreo, La Paz, Bolivia, pela contribuição com a casuística

Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, Chefe do Departamento de Anatomia Patológica, pela possibilidade de executar este estudo no departamento.

Prof^a Dr^a Isabela da Cunha Werneck, pelo auxílio e interpretação na técnica de FISH.

Prof. Dr. João Duprat, chefe da Oncologia Cutânea do Hospital A C Camargo, pelo apoio do deste departamento.

Prof. Dr. Humberto Torloni, Diretor Científico do SAME, pelo suporte e amizade.

Prof. Dr. Abrão Rapoport, diretor técnico do Hospital Heliópolis, pela atenção e apoio.

A Prof^a. Dr^a Maria Teresa Gianotti Galuppo, professora e amiga pela amizade e incentivo.

Melissa Lissae Fugimori, médica residente de patologia da Universidade Estadual de Botucatu, que auxiliou o levantamento da casuística

Rodrigo Crespo. Biólogo do Hospital A.C. Camargo, pela amizade apoio e auxílio na execução técnica.

Marina Gomes, bióloga do Departamento de Patologia do Hospital A C Camargo, pelo auxílio técnico.

Mérin Barbara Stamboni, aluna de mestrado da Fundação Antonio Prudente, pela auxílio e apoio.

Claudia Malheiros Coutinho Camillo, pós-Doutoranda da Fundação Antonio Prudente, Hospital A.C. Camargo, pela colaboração nos experimentos técnicos

Kátia Cândido Carvalho, pós-doutoranda da Fundação Antonio Prudente, Hospital A.C. Camargo, pela colaboração nos experimentos técnicos

Rafael Malagoli Rocha, biólogo do Hospital A C Camargo, Departamento de Anatomia Patológica, pela análise estatística.

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

Ao Sr. Jose Ivanildo Neves, pela realização da imunistoquímica e FISH, com extrema qualidade qualidade.

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

Ao Sr Severino da Silva Ferreira, funcionário do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de São Paulo, pelo excelente trabalho na confecção do *tissue microarray*.

À Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari, coordenadora da Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente

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

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

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

Ao Dr Dante Simionatto Netto, patologista e colega, pela amizade e apoio.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, participaram e contribuíram para esta pesquisa, proporcionando-me a oportunidade de realizá-la. Sem o apoio de todos, professores, médicos e auxiliares de diversos setores eu não poderia ter concluído este trabalho.

Muito obrigado

RESUMO

Caly DC. **Melanoma Acral-lentiginoso: análise de proteínas e genes do ciclo celular nas vias de sinalização p16/prb, p53 e PTEN.** São Paulo; 2010. [Tese Doutorado -Fundação Antônio Prudente]

Introdução. O melanoma acral-lentiginoso, o quarto tipo mais freqüente de melanoma, apresenta diferenças clínicas, epidemiológicas e na sua patogenia quando comparado aos demais tipos. Acomete principalmente afro-descendentes, asiáticos e hispânicos. Não se correlaciona com exposição solar, localizando-se em extremidades, evolução mais agressiva com menores índices de sobrevida. Frequentemente diagnosticado em estádios mais avançados, apresentando nível de Clark e profundidade de Breslow maiores. Poucos estudos avaliaram o melanoma acral-lentiginoso. Dentre as principais vias moleculares estudadas destacam-se as vias p16-pRb, p53, PI3K e a MAPK. Considerando, a sua ocorrência em áreas de mínima exposição solar, é provável que as alterações moleculares sejam diferentes dos demais tipos de melanomas, como constatado nos poucos estudos disponíveis. **Objetivo.** Estudar a expressão de proteínas e alterações em genes do ciclo celular, genes supressores de tumores e oncogenes nos melanomas acrais-lentiginosos. **Pacientes e métodos.** Estudo retrospectivo incluindo 43 pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo do tipo acral-lentiginoso realizado no Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital A C Camargo, cujos blocos de parafina do tumor primário estavam disponíveis nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica, e 10 pacientes cujos blocos foram enviados da Bolívia pelo Dr Martin Sanguenza. Confeccionou-se um microarranjo de tecidos (TMA) com todas as amostras, as quais foram avaliadas por técnicas de imunistoquímica e hibridização fluorescente in situ (FISH). Através da imunistoquímica foram avaliados os seguintes marcadores: ciclina D1, CDK4, p16, pRb, p21, p53. Através da técnica de FISH avaliou-se os

seguintes genes: CCND1, PTEN e p16. **Resultados.** A análise dos dados demográficos demonstrou que a idade variou de 31 a 90 anos, com média de 62 anos, sendo 86,8% localizados nos pés. Predomínio da fase vertical de crescimento (67,9%), nível de Clark acima de III; profundidade de Breslow acima de 4,0 milímetros, com contagem acima de 4 mitoses por dez campos de grande aumento. Na análise imuno-histoquímica houve forte marcação para CDK4 citoplasmática e p16. Pela técnica de FISH encontrou-se deleção do gene PTEN em 36,6%; deleção de p16 em 41% dos casos e amplificação de CCND1 em 28,6%. Não houve diferença significativa na sobrevida em cinco anos quando correlacionadas as variáveis. **Conclusões.** Predominaram melanomas nos pés, sendo a maioria dos casos muito profundos, acima de 4 mm de espessura de Breslow, indicando um diagnóstico tardio da doença. Foram encontradas deleções de PTEN (36,6%), p16 (41,9%) e amplificação de CCND1 (28,6%). Houve correlação de expressão de proteínas do ciclo celular entre si, com deleções de PTEN e p16, amplificação de CCND1. Os achados acima podem ter significado para modificar a abordagem diagnóstica de pacientes portadores de melanomas acrais. Estudos complementares com expansão da casuística são necessários para corroborar os achados da presente pesquisa.

SUMMARY

Caly DC. [Acral lentiginous melanoma: protein and cell cycle gene analysis of p16/pRb, p53 and PTEN pathways]. São Paulo; 2010. [Tese Doutorado -Fundação Antônio Prudente]

Background. Acral lentiginous melanoma frequency is fourth among histopathological subtypes of melanoma. The clinical and epidemiological aspects as well as the pathogenesis, compared to other subtypes is different, affecting afro-descendants, asians and hispanics in non sun-exposed areas, and are frequently diagnosed in later stages. Some of the most important molecular aspects evaluated in melanomas include the CDKN2A Locus, Cyclins, Cyclin-Dependent Kinases, Retinoblastoma gene, TP53, PI3K and the MAPK, among others. Numerous investigations have been conducted in order to clarify the process of carcinogenesis and prognostic factors. However the mechanisms of development of melanoma and the factors predictive of outcome are still under evaluation. Few researches have been conducted to study acral-lentiginous melanoma. **Objective.** To evaluate the expression of cell-cycle protein and tumor suppressor genes and oncogenes in melanoma acral-lentiginous with Immunohistochemistry and Fluorescent In situ Hybridization. **Patients and methods.** A retrospective study of 43 patients diagnosed with melanoma acral-lentiginous type conducted by the Center for Treatment and Research of the Hospital AC Camargo, whose paraffin blocks of primary tumor were available in the archives of the Department of Pathology, and 10 patients from Bolivia. The specimens were studied in a tissue microarray, and by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization (FISH). Cyclin D1, CDK4, p16, pRb, p21, p53 expression were evaluated by immunohistochemistry, whereas the genes CCND1, PTEN and p16 were evaluated by FISH technique. **Results.** Epidemiological features: age ranged 31-90 years (mean 62 years), 86.8% located in the feet. Vertical growth phase prevailed (67.9%) as well as Clark's

level III or greater, Breslow's depth over 4.0 mm, and a mean mitotic rate of four mitoses per ten high power fields. In immunohistochemical analysis there was strong labeling for cytoplasmic CDK4 and p16. FISH gene analysis showed 36.6% PTEN deletion; 41% p16 deletion and 28.6% CCND1 amplification. There was no significant difference in survival at five years. Conclusions: a. Acral-lentiginous melanoma prevailed on the feet, being in most cases very deep, up to 4 mm Breslow thickness, indicating a late diagnosis of the disease. FISH analysis allowed to find gene deletions in PTEN and p16, as well as amplification of CCND1. Cell cycle protein expression correlated among each other, and with PTEN and p16 deletions, as well as with CCND1 amplification. Our findings could aid in the diagnostic approach of patients with acral melanomas. Nonetheless, further investigations with larger series are necessary to clarify some of the aspects herein presented.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração esquemática do controle do ciclo celular pelas ciclinas, CDK4 e inibidores das quinases ciclina dependentes (CKIs).....	11
Figura 2	Esquema resumido das vias envolvidas na biologia molecular do melanoma.....	17
Figura 3	Estudo imunoistoquímico.....	37
Figura 4	Distribuição das frequências de PTEN, p16 e CCND1 por FISH.....	39
Figura 5	Exame pela técnica de FISH, para PTEN.....	40
Figura 6	Exame pela técnica de FISH, para p16.....	40
Figura 7	Exame pela técnica de FISH, para CCND1.....	41

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição resultados demográficos.....	32
Tabela 2	Distribuição resultados histopatológicos.....	34
Tabela 3	Distribuição de frequências segundo o tempo de seguimento em meses.....	35
Tabela 4	Distribuição de frequências segundo o status de seguimento..	35
Tabela 5	Distribuição dos valores obtidos pelo score combinado de marcação (ACIS III) para marcadores imunoistoquímicos, por técnica imunoistoquímica.....	36
Tabela 6	Distribuição da frequências de deleção de PTEN através da técnica de FISH.....	38
Tabela 7	Distribuição da frequências de deleção de p16 através da técnica de FISH.....	38
Tabela 8	Distribuição da frequências de deleção de CCND1 através da técnica de FISH.....	38
Tabela 9	Correlações entre CDK4 nuclear e demais marcadores imunoistoquímicos.....	42
Tabela 10	Correlações entre ciclina D1 e demais marcadores imunoistoquímicos.....	42
Tabela 11	Correlações entre p16 e demais marcadores imunoistoquímicos.....	42

Tabela 12	Correlações entre p21 e demais marcadores imunoistoquímicos.....	42
Tabela 13	Correlações entre p53 e demais marcadores imunoistoquímicos.....	43
Tabela 14	Correlações entre pRb e demais marcadores imunoistoquímicos.....	43
Tabela 15	Correlações entre variáveis morfológicas e marcadores imunoistoquímicos.....	43
Tabela 16	Teste de Mann-Whitney para comparação de intensidades de imunoistoquímica das proteínas do ciclo celular, comparando amostras do Brasil e Bolívia.....	44
Tabela 17	Teste exato de Fisher para comparação entre frequências de deleção de PTEN e p16 e amplificação de CCND1 entre amostras do Brasil e Bolívia.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

DCK	ciclina dependente de quinsase
FISH	Hhibridização in situ fluorescente
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MAL	melanoma acral lentiginoso
PKB/AKT	proteína quinase B
SEER	Surveillance Epidemiology and end Results
TMA	Tissue Microarray
WHO	World Health Organization

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia	1
1.2	Fatores histopatológicos de prognóstico	3
1.3	Melanoma Acral-lentiginoso	5
1.4	Biologia molecular do melanoma.....	8
1.5	Lócus CDKN2A	9
1.6	Ciclinas e Quinases Dependentes de Ciclinas	10
1.7	Gene do retinoblastoma	12
1.8	Gene p53.....	13
1.9	Via PI3K.....	15
1.10	Via Mapkinase	16
1.11	Considerações.....	19
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos.....	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Dados demográficos e clínicos.....	21
3.2	Parâmetros histológicos	22
3.3	Critérios de inclusão	23
3.4	Microarranjos de tecido	24
3.5	Estudo imunoistoquímico.....	24
3.5.1	Protocolo de reação imunoistoquímica.....	25
3.5.2	Leitura das lâminas	27
3.6	Estudo por Hibridização in situ por fluorêscencia	28
3.6.1	Protocolo de reação de hibridização por fluorêscencia	28
3.7	Análise estatística.....	30

4	RESULTADOS	32
4.1	Casuística e dados demográficos.....	32
4.2	Resultados histopatológicos.....	33
4.3	Estadiamento e seguimento.....	35
4.4	Estudo imunoistoquímico.....	36
4.5	Hibridização in situ fluorescente.....	38
4.6	Teste de correlação entre variáveis.....	41
4.7	Sobrevida (Kaplan-Meyer).....	44
4.8	Testes comparativos entre amostra do Brasil e Bolívia.....	44
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

O melanoma é uma neoplasia maligna originada em melanócitos cutâneos, que vem aumentando a incidência em todo o mundo, inclusive no Brasil, não só por um aumento real por fatores ambientais, mas também pelo diagnóstico mais precoce e acurado (VRIES et al. 2003; SORTINO-RACHOU et al. 2006).

Acomete preferencialmente indivíduos de pele clara (Fitzpatrick I e II), com evolução desfavorável quando diagnosticado tardiamente (SHEN et al. 2003).

Nos EUA, dados do Surveillance Epidemiology and end Results. (SEER) indicam que o melanoma é a sexta neoplasia mais incidente, sendo a quinta na população caucasiana, enquanto nas demais etnias é baixa sua incidência (SEER 2010).

No Brasil o melanoma é menos freqüente do que os outros cânceres de pele (basocelular e carcinoma de células escamosas), no entanto, sua letalidade é mais elevada. Estimativas do INCA para 2010, prevêm cerca de 5.930 casos novos de melanoma, sendo 2960 casos na população masculina e 2970 na população feminina. As maiores taxas de incidência por estado ocorrem em São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina (Ministério da Saúde 2009).

Levantamento epidemiológico realizado em Santa Catarina demonstra que 55,6% dos casos acometeram a população feminina, com localização preferencial em tronco e face, sendo o tipo extensivo superficial o mais encontrado (BATTISTI et al. 2009). Em Goiânia, levantamento feito pelo registro hospitalar de câncer entre 1988 e 200, mostrou índices de incidência e mortalidade crescentes, tanto para a população masculina como para a feminina (SORTINO-RACHOU et al. 2006).

Estudos epidemiológicos na Europa demonstraram tendência de diagnóstico mais precoce e lesões com menor espessura, e com correlação com a latitude geográfica (VRIES et al. 2004).

Atua também como fator de risco associado na gênese do melanoma a exposição a radiação ultravioleta artificial (VEIEROD et al. 2003).

A Organização Mundial de Saúde-OMS classifica o melanoma em em dez sub-tipos, e os quatro mais comuns são: extensivo superficial, nodular e lentigo maligno e acral lentiginoso (WHO 2006). Entretanto, outras classificações foram propostas baseadas no tipo de exposição solar, e em critérios epidemiológicos, como segue: a) melanoma de crescimento lento em áreas com exposição solar intermitente; b) melanoma de crescimento muito lento localizado em áreas de exposição solar crônica, com aumento moderado na incidência e acessível ao diagnóstico precoce; c) melanoma de crescimento rápido, localizado em qualquer sitio anatômico mas com predileção a áreas permanentemente expostas (LIPSKER et al. 2007).

1.2 FATORES HISTOPATOLÓGICOS DE PROGNÓSTICO

Os principais fatores de prognósticos de melanoma estão relacionados aos dados histopatológicos. O nível de Clark, estratifica a neoplasia segundo a invasão das estruturas anatômicas da pele, desde a epiderme até a tela subcutânea (níveis de I a V), que se correlaciona com o prognóstico. Como descrito por diversos autores, a sobrevida é inversamente proporcional ao nível de invasão neoplásica segundo o nível de Clark (MORTON et al. 1993; GARBE et al. 2000; BARNHILL et al. 2005).

A espessura de Breslow quantifica a invasão em milímetros, a partir da camada granulosa da epiderme. É bem estabelecida a relação entre sobrevida e espessura de Breslow, tendo os pacientes com melanomas mais finos (espessura menor que 1,0 mm) sobrevida de 95% em cinco anos, ocorrendo diminuição desses índices com o aumento da espessura (MORTON et al. 1993). Além da relação com sobrevida, as lesões mais espessas correlacionam-se com maior risco de metástase linfonodal (BÜTTER et al. 2005). A espessura neoplásica também relaciona-se ao risco de recorrência, metástase em trânsito e satelitose (FLORELL et al. 2005). A espessura de Breslow é mais reprodutível e fidedigna do que o nível de invasão de Clark (BUZAID et al. 1997; BYERS et al. 1998).

O melanoma pode apresentar dois padrões de crescimento, o radial (crescimento horizontal) ou vertical (crescimento invasivo em profundidade). Os melanomas com padrão de crescimento radial apresentam melhor prognóstico comparado ao padrão vertical (THÖRN et al. 1994).

A presença de infiltrado inflamatório relaciona-se com a capacidade de resposta do paciente, e é considerada como variável prognóstica independente (CLARK et al. 1989).

O índice mitótico, de acordo com a AJCC (BALCH et al. 2001), não era considerado fator prognóstico no estadiamento de melanomas cutâneos. No entanto, de acordo com dados da tese de mestrado de Soares de Sá, no qual foi avaliada a expressão de proteínas relacionadas à proliferação celular e apoptose em 136 casos de melanoma extensivo superficial, a contagem do número de mitoses influencia a sobrevida livre de doença e talvez tenha importância marginal na sobrevida global (DE SÁ et al. 2009). A nova proposta de estadiamento da AJCC já estabelece as mitoses como fator prognóstico do melanoma (BALCH et al 2009),

A regressão histológica é encontrada em cerca de um terço dos casos de melanoma. Ao contrário do que se esperaria, o encontro de regressão tem sido associado a um pior prognóstico, possivelmente indicando que a neoplasia antes do processo regressivo estaria a uma profundidade maior do que a atualmente encontrada, portanto, com evolução mais reservada (CLARK et al. 1989). Outros autores mostraram risco maior de metástase em pacientes com melanomas finos quando presentes áreas de regressão (COOK et al. 2002; GUITART et al. 2002), enquanto outros autores não evidenciam esta correlação (LEFEVRE et al. 2003). Em 2008, estudo para se estabelecer a correlação entre sobrevida e presença de regressão não conseguiu evidenciar este vínculo (PANTALEÃO et al. 2008).

Ulceração é definida como solução de continuidade da epiderme com

a presença de tampão fibrino-leucocitário sobre a neoplasia, e é considerado um fator de pior prognóstico (Balch et al 2001)

1.3 MELANOMA ACRAL-LENTIGINOSO

O tipo acral-lentiginoso (ALM) apresenta epidemiologia, clínica e patogenia diferente dos demais tipos de melanoma (CASCINELLI et al. 1994; KAGESHITA et al. 2000).

Trata-se de neoplasia melanocítica maligna pouco comum na população caucasiana, sendo predominante em asiáticos, hispânicos e afro-descendentes (CASCINELLI et al. 1994; RIDGEWAY et al. 1995; CRESS e HOLLY 1997; BRANDÃO et al. 2005). Acomete menos de dez por cento da população caucasiana, porém esses índices podem chegar a cinquenta por cento na populações asiática e exceder a sessenta por cento em populações negras (CRESS 1997; RICHARD et al. 2000). Na África do Sul, este tipo tem freqüência de 32,5% dos melanomas (SWAN e HUDSON 2003), enquanto em Taiwan, um estudo de 181 melanomas evidenciou que esta porcentagem atingia 58% (CHANG et al. 2004). No Japão, levantamento epidemiológico realizado demonstrou alta freqüência do tipo acral lentiginoso, sendo mais comum na sola dos pés (ISHIARA et al. 2008).

No Brasil, estatísticas evidenciam uma grande variação na sua distribuição, sendo menos prevalente nas regiões sul e sudeste, com freqüências de 5 a 13%, prevalecendo na região nordeste onde relatou-se freqüências de até 19% do total de melanomas (BRANDÃO et al. 2005).

Considerando que cerca de 60% da população de Salvador é afro-descendente, é possível que o fator etnia contribua para esta maior frequência de melanomas acrais-lentiginosos.

Ocorre nas extremidades, em regiões não expostas à radiação ultravioleta, como nas palmas, solas e regiões subungueais (RIDGEWAY et al. 1995; CRESS e HOLLY 1997; KUCHELMEISTER et al. 2000).

A sua patogenia é pouco conhecida e não parece relacionada a lesões névicas precursoras (KUCHELMEISTER et al. 2000).

Trata-se de lesão agressiva, de crescimento insidioso pela dificuldade de visualização (em geral na planta dos pés ou palma das mãos) (LANGLEY et al. 1998). Tem sobrevida global aproximada de 40% em 5 anos (CHANA et al. 2000) e acredita-se que o pior prognóstico do melanoma acral-lentiginoso quando comparado aos outros subtipos, seja devido ao diagnóstico em estádios mais avançados (LANGLEY et al. 1998; STALKUP et al. 2002).

Ao exame histológico é caracterizado na sua fase "in situ", por melanócitos anaplásicos, frequentemente dendríticos muito pigmentados, intraepidérmicos, dispostos em padrão lentiginoso ao longo da camada basal, se disseminando entre as várias camadas de queratinócitos (RIDGEWAY et al. 1995). Quando invasivo, não difere substancialmente dos melanomas de outros sítios anatômicos. O comportamento biológico parece depender, a exemplo de outros melanomas, de fatores como profundidade de infiltração, ulceração, mitoses, invasão de vasos sanguíneos, linfáticos

e/ou comprometimento perineural, além da disseminação linfática ou sistêmica.

Análise retrospectiva de cento e vinte um casos de melanoma acral lentiginoso na França, avaliando características histopatológicas relacionadas ao prognóstico, demonstrou que a maioria dos casos eram melanomas em fase vertical de crescimento, espessos, com nível de Clark acima de III, ulcerados, e índice mitótico acima de seis mitoses por dez campos de grande aumento. Este estudo também concluiu que a sobrevida livre de doença e global se correlacionaram com o nível de Clark IV e V, o índice mitótico e a presença de satelitose microscópica (PHAN et al. 2007).

Levantamento feito sobre incidência e sobrevida do melanoma acral lentiginoso nos Estados Unidos, através do banco de dados do SEER, evidenciou 36% deste subtipo na população afrodescendente. A sobrevida foi pior na população hispânica não branca, seguida pelos afrodescendentes e piores índices nos asiáticos e hispânicos brancos. Os fatores que mais influenciaram na sobrevida foram a espessura do tumor e estadiamento avançado (BRADFORD et al. 2009).

No programa de iniciação científica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A.C. Camargo, a aluna Melissa Lissae Fugimori, avaliou melanomas acrais lentiginosos com parâmetros clínicos, histopatológicos e de sobrevida. Coletou-se 48 melanomas sendo 24 pacientes do sexo feminino e 23 masculinos, com idade média de 61,49 anos, dos quais 12 (25%) em pacientes negros ou pardos e 36 (75%) em brancos. Foram avaliados por um período médio de 45,58 meses (mediana

de 33,94 meses). Quando a informação esteve disponível, não foram encontrados fatores de risco encontrados em melanomas de áreas expostas ao sol, como pele de tipo I e II de Fitzpatrick, nevos atípicos, congênitos ou múltiplos e queimadura solar. À exceção de um paciente, não houve história familiar (2%). A localização primária predominou nos pés (97,9%). Dentre os dados relevantes, ressalta-se que nesta amostra, a maioria dos melanomas eram invasivos, sendo 68,6% acima de 2 mm de profundidade, isto é, diagnosticados tardiamente. Corroborando o achado, 48% estavam em estágio IV ao diagnóstico, sendo que pacientes em estágios precoce (I ou II) 79,1% se encontravam vivos, enquanto que aqueles com estágios tardios (III ou IV), apenas 32,9% estavam vivos.

1.4 BIOLOGIA MOLECULAR DO MELANOMA

Os melanócitos são células originárias da crista neural do embrião, localizadas ao longo da camada basal da epiderme cuja principal função é a produção da melanina, um pigmento marrom escuro, conferindo fotoproteção natural (GRENN et al. 2004; RIZOS et al. 2004).

Os melanócitos humanos apresentam-se normalmente quiescentes e irão proliferar com estímulos específicos como a radiação ultra-violeta e cicatrização (RIZOS et al. 2004). Este controle de proliferação é exercido através do ciclo celular e seus sinais regulatórios. Diversas vias atuam durante o ciclo celular como mecanismos de controle tanto estimulando ou inibindo o ciclo para que a divisão celular ocorra normalmente. Durante o

processo do ciclo celular existem pontos estratégicos de parada (“*checkpoints*”) para regular a taxa de divisão e reparar eventuais danos ao DNA, onde são necessários determinados estímulos para que o ciclo continue. Esses pontos ocorrem entre a transição G1/ S e G2/M e são feitos pelas ciclinas e pelas Ciclinas dependentes de quinases (CDK).

Dentre as principais vias moleculares estudadas destacam-se as vias p16-pRb, p53, PI3K e a MAPK.

1.5 LÓCUS CDKN2A

O locus CDKN2A localiza-se no cromossomo 9p21, codifica proteínas que regulam duas importantes vias de controle do ciclo celular, a via do gene p53 e do retinoblastoma. As proteínas codificadas por este gene, são a TP16INK4 e TP14ARF (QUELLE et al. 1995).

A proteína p16INK4 liga-se às cinases dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4 e CDK6), inibindo a formação do complexo ciclina-CDK e impedindo a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRB), desta maneira interrompendo o ciclo celular (STOTT et al. 1998). A perda da expressão de p16 nos melanomas associa-se com maior capacidade de invasão, metástase e pior prognóstico (HOLLAND et al. 1995; ZHANG e ROSDAHL 2004). A inativação do gene supressor de tumores p16 (CDKN2A), também é um evento precoce no desenvolvimento e progressão dos melanomas acrais-lentiginosos, explicando em parte a agressividade tumoral e a baixa taxa de sobrevivência dos pacientes (CHANA et al. 2000).

A proteína p14ARF atua no controle da proliferação celular atuando sobre a via p53/Mdm2. O gene Mdm2, localizado no braço longo do cromossomo 12, codifica uma fosfoproteína nuclear de mesmo nome, cuja principal função é regular os níveis e atividade de p53. As proteínas p53 e Mdm2 possuem um mecanismo de *feed-back* autoregulado. Além deste mecanismo a proteína p14ARF age ligando-se a domínios específicos da proteína Mdm2 para bloquear a degradação de p53 (MA et al. 2006).

A avaliação da inativação do gene p16 nos melanomas foi objeto de estudo num trabalho comparativo entre pacientes com lesões névicas (nevo comum e displásico) e melanomas (primários e secundários), por técnica de hibridização, evidenciando deleções pouco frequentes nas lesões névicas, sendo maiores progressivamente nas lesões primárias e metastáticas (SINI et al. 2008).

A evidência de participação do p16 nos melanomas também foi observada em estudo imunoistoquímico de 28 nevus e 24 melanomas primários, demonstrando expressão aumentada nas lesões malignas (DEMIRKAN et al. 2007).

1.6 CICLINAS E QUINASES DEPENDENTES DE CICLINAS

O bloqueio da atividade da ciclina D1 antes do ponto de restrição impede a entrada das células na fase S do ciclo celular. A ciclina D1 atua como fator de crescimento e estímulo do ciclo celular. É codificada pelo gene CCND1, que se localiza no cromossomo 11q13. A superexpressão de

ciclina D1 está relacionada ao desenvolvimento de diversas neoplasias (GREER et al. 2006; WANG et al. 2006).

A quinase dependente de ciclinas 4 (CDK-4) deve fosforilar substratos de modo que a célula possa sair da fase G1 do ciclo celular. Ao mesmo tempo, a hiperfosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb) é necessária para ocorrer para a entrada do ciclo na fase S (COTRAN et al. 2000).

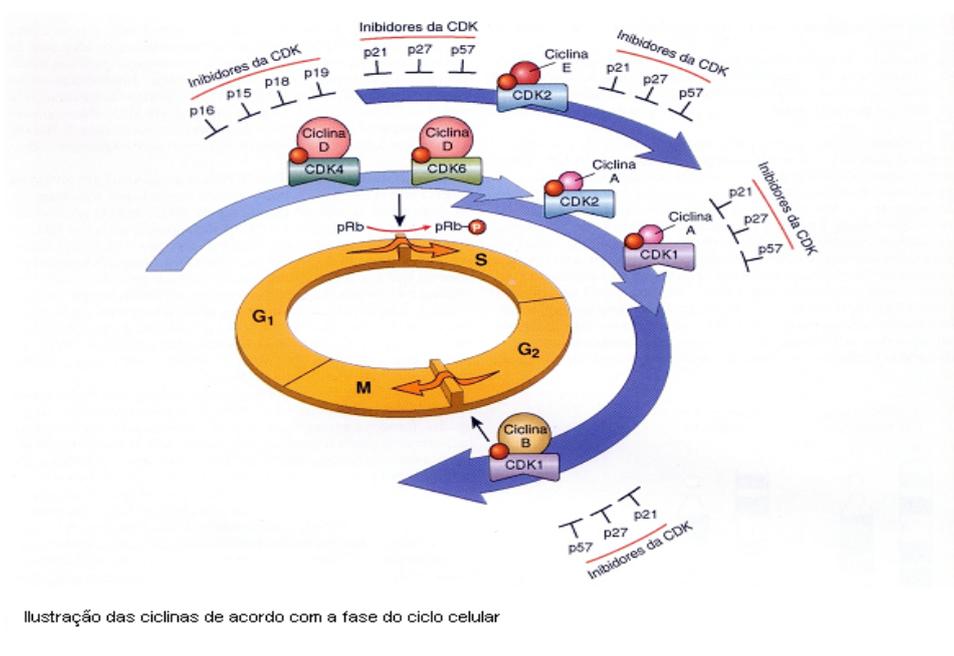


Figura 1 - Ilustração esquemática do controle do ciclo celular pelas ciclinas, CDK4 e inibidores das quinases ciclina dependentes (CDKIs). As setas maiores mostram as fases do ciclo celular durante as quais os complexos ciclinas/CDK específicos são ativos. Conforme ilustrado, a ciclina D/CDK4, a ciclina D/CDK6 e a ciclina E/CDK2 regulam a transição G1/S através da fosforilação da proteína Rb (pRb). A ciclina A/CDK2 e ciclina A/CDK1 são ativas na fase S. A ciclina B/CDK1 atua na transição G2/M. Uma das famílias inibidores de CDK, composto por p16,p15,p18,p19 atuam sobre ciclina D/CDK4 e a ciclina D/CDK6. A outra família coposto pela p21,p27 e p57 podem inibir todas as CDKs. (COTRAN et al. 2000).

Nos melanomas há relatos de que a superexpressão da ciclina D1 relaciona-se com progressão tumoral e pior prognóstico (BHATT et al. 2005).

Em recente dissertação de mestrado estudando a expressão de proteínas do ciclo celular de melanomas extensivos superficiais, constatou-se diferenças de expressão de Ciclina D1, p16 e CDK4 citoplasmática entre melanomas mais espessos e melanomas finos (DE SÁ et al. 2009).

1.7 GENE RETINOBLASTOMA

No cromossomo 13q14 encontramos o gene RB1, que codifica a proteína do retinoblastoma (pRB). Esta proteína é uma fosfoproteína nuclear que desempenha importante papel na regulação do ciclo celular. É encontrada em todos os tipos celulares tanto numa forma ativa (subfosforilada) como na forma inativa (hiperfosforilada). No estado ativo a pRb atua como fator de regulação negativa no ciclo celular, através da sua capacidade de ligar-se ao fator de transcrição E2F e reprimir a transcrição de genes necessários para a fase S (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Quando estimulada a proteína Rb inativa-se por hiperfosforilação, assim liberando esse mecanismo inibitório e permitindo a progressão do ciclo celular.

A inativação do gene do retinoblastoma foi descrita em vários tipos de cânceres como mama, próstata, osteossarcoma e pulmão (BIANCHI et al. 1994).

Estudos sobre a participação das alterações da proteína Rb ainda são controversas no melanoma (LI et al. 2006), porém já foi demonstrado que a perda de expressão do gene Rb pode estar relacionada com maior infiltração do melanoma e menores taxas de sobrevida (KORABIOWSKA et al. 2001).

1.8 GENE p53

O gene da proteína p53 (TP53), descrito primeiramente em 1979, foi o primeiro gene supressor de tumor a ser identificado. Está localizado na posição cromossômica 17p13.1, apresentando uma estrutura com 11 éxons e um tamanho de 19179 pares de base (MILLER et al. 1986). Este gene faz parte de uma família de genes altamente conservados a qual inclui pelo menos dois outros membros: p63 e p73 (LEVRERO et al. 2000). O p53 codifica uma fosfoproteína de 53 kD geralmente encontrada no núcleo, composta de 393 aminoácidos, sendo os monômeros organizados numa conformação tetramérica (dímeros de dímeros) em uma estrutura clássica para um fator de transcrição seqüência-específica (LEVINE 1997). O primeiro éxon é descrito como não codificante, estando separado dos demais por um íntron de 10.740 pb. Os demais éxons codificam o monômero da estrutura tetramérica da proteína e podem ser agrupados em três regiões de acordo com os domínios polipeptídicos determinados pelas suas seqüências.

O gene 53 tem sido muito estudado nos últimos anos por várias razões: a) é o gene mais comumente alterado nos cânceres humanos (HOOBSTEIN et al. 1991); b) suprime o crescimento celular de células tumorais (BAKER et al. 1990); c) mutações na linhagem germinativa do p53 têm sido implicadas com o risco de desenvolvimento de câncer (Síndrome de Li-Fraumeni) (SRIVASTAVA et al. 1990); d) aumento na concentração do p53 selvagem tem sido associado à parada do ciclo celular (KANSTAN et al. 1991) e morte celular programada (SHAW 1996). supressores de tumor. Em 1989, VOGELSTEIN e MINA foram os primeiros a relatar a presença de mutações no gene p53 associadas ao câncer colorretal e câncer de pulmão (NIGRO et al. 1989; TAKAHASHI et al. 1989).

A proteína p53 normal tem como função induzir a uma parada reversível do ciclo celular para permitir o reparo do DNA (LANE 1992). Quando há um dano genético a proteína p53 irá estimular a estimulação do gene Cip1 que codifica a proteína p21. Esta proteína tem como função parar o ciclo celular impedindo a ligação do complexo ciclina-CDK. Tendo sido interrompido o ciclo celular, mecanismos de reparo do DNA são acionados, ou se o reparo não for bem sucedido ocorrer a estimulação das vias de apoptose.

Mutações no gene p53, induzidas pela radiação ultravioleta e correlacionadas com carcinoma espinocelular e basocelular são descritas por diversos autores (BRASH et al. 1991; DUMAZ et al. 1993; ZIEGLER et al. 1994).

A exposição à radiação ultra-violeta ocasiona alterações nas vias de apoptose p53-dependentes, variando conforme seja radiação UVA e UVB. Na radiação UVA o dano ocorre por indução de stress oxidativo, enquanto a radiação UVB induziria mutações diretamente no gene (NOONAN e DE FABO 2009; ABD ELMAGEED et al. 2009).

A participação da via da p53 no melanoma ainda é controversa. Alguns estudos demonstram associação significativa entre a expressão da p53 e espessura do tumor acima de 1,5mm, nível de Clark IV e V, ulceração, embolização linfática, altos índices mitóticos e baixa sobrevida a cinco anos (YAMAMOTO et al. 1995; COUPLAND et al. 2000). Entretanto outros trabalhos mostram não haver correlação da expressão da p53 com fatores clínicos e prognósticos (FLORENES et al. 1995).

1.9 VIA PI3K

A PI3K é uma enzima que, em resposta a fatores de crescimento, promove a fosforilação do fosfolipídeos de membrana, aumentando o nível de fosfatidilinositol tri-fosfato (PIP 3), ativando a proteína quinase B (PKB ou AKT), que por sua vez fosforila e inativa proteínas de bloqueio do ciclo celular ou estimulam a apoptose (CANTREL 2001).

O gene PTEN é um supressor de tumor, localizado no cromossomo 10q22-23. Codifica uma fosfatase citoplasmática que defosforila o segundo mensageiro PIP3, inibindo a proteína-quinase AKT, a qual é responsável pela transdução de sinais de sobrevivência e proliferação celular e inibição

de apoptose. Desta forma, antagoniza a via PI3K, promovendo a parada do ciclo celular (PEZZOLESI et al. 2007).

Mutações no PTEN já foram descritas em várias neoplasias como glioblastomas, mama, endométrio e próstata (HAAS-KOGAN et al. 1998; PÉRES-TENORIO et al. 2002; GRIINWALD et al. 2002).

A presença de mutação do gene PTEN está presente em uma porcentagem dos casos de melanoma (GOEL et al. 2006).

A perda de PTEN é descrita principalmente nos melanomas não familiares e quase 50 % dos casos tem inativação por mutação, metilação ou deleção (RAMASWAMY et al. 1999; STAHL et al. 2003; DAHL et al. 2007).

1.10 VIA DA PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR MITOSES (MAPK)

As proteínas ras foram descobertas pela primeira vez na forma de oncogenes virais. Cerca de 10 a 20% dos cânceres humanos apresentam mutações das proteínas ras. As proteínas ras atuam como fatores mitogênicos induzido por fatores de crescimento. Elas se localizam na membrana plasmática e alternam entre uma forma ativa e uma forma inativa. Quando ativadas por fatores de crescimento trocam o guanossina-difosfato para o guanossina-trifosfato e estimulam uma cascata de ativação citoplasmática estimulando a via mitogen-activated protein kinase (MAPK)

que por sua vez tem como alvo fatores de transcrição nuclear, dessa maneira promovendo a mitogênese.

A via MAPK vem sendo muito estudada na patogênese dos melanomas. Demonstrou-se mutações nos genes Braf e Ras tanto em melanomas como em lesões melanocíticas atípicas (URIBE et al. 2003).

O gene BRAF codifica uma serina-treoninina quinase que atua na via de ativação mitogênica da proteína quinase. A ativação por mutação que causa expressão constitutiva do BRAF induz a uma ativação constante dos sinais de transdução celular ocasionando um importante mecanismo pró-mitogênico e com potencial de transformação maligna (FECHER AL et al.2007).

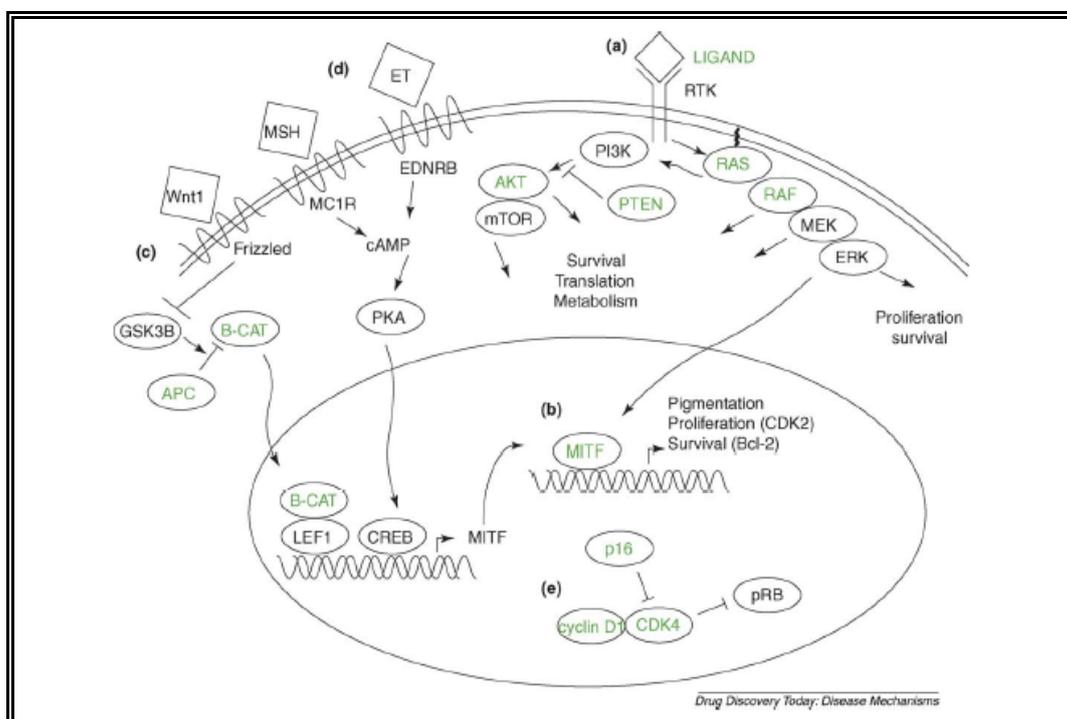


Figura 2 - Esquema resumido das vias envolvidas na biologia molecular do melanoma. As ativações das vias RAS e RAF constituem-se de potentes vias de transdução, sinalizando para a divisão celular. Outra via também envolvida é a do PTEN, sendo que sua inativação permitiria a ativação da via AKT, envolvida no mecanismo de proliferação e sobrevivência celular.

MALDONADO et al. em 2003 observou diferentes frequências de mutações no gene BRAF em melanomas com exposição solar intermitente e não expostos ao sol. CURTIN et al. (2005) comparou as frequências de mutações existentes entre os genes BRAF, KRAS, Ciclina D1 e p16 por CGH entre quatro grupos de melanoma (acral, mucoso, melanoma em regiões de exposição crônica com dano solar e melanomas em pele sem dano solar crônico (exposição intermitente) e concluiu haver diferentes patogêneses nos melanomas, o que permitiria classificá-los molecularmente. Nos melanomas com exposição solar intermitente, predominaram mutações em BRAF e N-RAS, enquanto nos outros tipos, a frequência destas mutações foi baixa. Quando os melanomas expressavam BRAF e N-RAS selvagem, encontrou-se aumento do número de cópias dos genes CDK4 e CCDN1. As alterações do gene Braf no códon 600 estão presentes em cerca de 50 a 70% dos casos de melanoma, indicando que a efetiva participação da via da MAPK neste processo de tumorigênese (FLOCKHART et al. 2009). Outro estudo indica que as alterações no códon 600 do BRAF são fatores de controle de crescimento no melanoma (KIDO et al. 2009).

Diferentes expressões de BRAF foram relatadas entre melanomas invasivos e melanomas *in situ* (POYNTER et al. 2006).

1.11 CONSIDERAÇÕES

São numerosas as investigações no estudo das vias moleculares envolvidas na gênese e prognóstico dos melanomas, porém estas ainda não estão totalmente esclarecidas. Há necessidade de explicar a razão pela qual pacientes com indicadores prognósticos favoráveis evoluem com disseminação do melanoma, enquanto outros com indicadores desfavoráveis têm sua cura.

Critérios histopatológicos tradicionais têm grande importância como indicadores prognósticos, porém são ainda insuficientes para determinar com precisão o prognóstico da doença. Entretanto, são escassos os estudos que avaliam a participação das vias de sinalização e ciclo celular na evolução e patogênese do melanoma acral-lentiginoso.

Considerando a grande participação de afro-descendentes e orientais na composição étnica brasileira, grupo populacional onde incide a maioria dos melanomas lentiginosos acrais, seria muito importante ampliar o conhecimento sobre esta doença em nosso meio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a expressão de proteínas e alterações em genes do ciclo celular, genes supressores de tumores e oncogenes nos melanomas acrais-lentiginosos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Criar um banco de dados clínico e anatomopatológico de melanomas acrais-lentiginosos correlacionando os dados histopatológicos às variáveis clínicas.
2. Estudar a expressão de proteínas do ciclo celular (p53, ciclina D1, p16,pRb,CDK4 e p21) por imunistoquímica em cortes obtidos pela técnica de tissue microarray.
3. Avaliar a amplificação ou deleção dos genes p16INK4A, CCDN1 e PTEN, através da técnica de hibridização in situ fluorescente.
4. Correlacionar a expressão imunistoquímica e amplificação ou deleção dos genes p16, CCDN1 e PTEN entre si.
5. Correlacionar a expressão imunistoquímica (p53, ciclina D1, p16,pRb,CDK4 e p21), e da hibridização in situ fluorescente (p16INK4A, CCDN1 e PTEN, com variáveis anatomopatológicas e a evolução clínica dos pacientes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Em estudo retrospectivo, os prontuários de pacientes diagnosticados com melanoma acral-lentiginoso foram avaliados para obtenção de variáveis demográficas, de estadiamento, de tratamento e evolução clínica do paciente, conforme protocolo estabelecido pelo Grupo Brasileiro de Melanoma. (Anexo I). Para cada caso de melanoma acral-lentiginoso, utilizou-se um protocolo, ao qual anexa-se uma cópia do laudo anatomopatológico constando o número de RGH do paciente e confirmação diagnóstica.

3.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Dados do paciente: data de nascimento, idade ao diagnóstico, sexo, raça, naturalidade, nacionalidade;

Fatores de risco: história familiar de melanoma maligno, grau de parentesco, fototipo de pele, Segundo Fitzpatrick, nevo melanocítico atípico, nevo congênito, nevo melanocítico múltiplo, história de queimadura solar, melanoma relacionado à gravidez;

Dados do tumor (clínica): data do diagnóstico (no hospital), tumor metacrônico, tamanho da lesão primária, localização da lesão primária (cabeça e pescoço, tronco, MMSS, MMII, mãos ou pés);

Histopatologia da lesão primária: tipo histológico (melanoma acral-

lentiginoso invasivo, melanoma acral-lentiginoso in situ), tipo de crescimento (vertical ou radial), Breslow (mm), Clark, índice mitótico, presença de ulceração, presença de regressão;

Estadiamento locorregional: pesquisa de linfonodo sentinela (LNS), número do anatomopatológico do LNS, data da cirurgia, base linfonodal encontrada (axilar, inguinal, cervical, poplítea, outras) e resultado do exame histopatológico (LNS positivo/LNS encontrado, macro ou micro);

Metastases: presença de doença metastática, local (pele, linfonodo, víscera);

Estadiamento AJCC 2001: tumor, nódulo, metástase, estadiamento final; (BALCH et al. 2001);

Evolução da doença: primeira alteração de estágio, data da primeira alteração de estágio e novo estágio, segunda alteração de estágio, data da segunda alteração de estágio e novo estágio, data da última notícia, status do paciente (vivo com doença, vivo sem doença, morte por câncer, morte por outras causas).

3.2 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS:

No Departamento de Anatomia Patológica, verificou-se a disponibilidade dos preparados histológicos e blocos de parafina para a revisão e avaliação histopatológica dos casos, estabelecendo-se os parâmetros prognósticos de acordo com protocolo estabelecido pelo Grupo Brasileiro de Melanoma e pela Sociedade Brasileira de Patologia. Dos

dados anatomopatológicos foram utilizados para análise estatística, os seguintes parâmetros:

1. tipo histológico (melanoma acral-lentiginoso invasivo, melanoma acral-lentiginoso *in situ*);
2. tipo de crescimento (vertical ou radial);
3. espessura de Breslow (mm);
4. nível de Clark;
5. índice mitótico;
6. presença de ulceração;
7. presença de regressão.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes cujo diagnóstico de melanoma acral-lentiginoso tenha sido realizado no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer e cujos blocos de parafina estivessem disponíveis nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica, dispo de material suficiente para confecção do *tissue microarray*, e 10 pacientes cujos blocos foram enviados da Bolívia pelo Dr Martin Sanguenza.

Pacientes com pelo menos 2 anos de seguimento clínico encontrado nos prontuários a partir do diagnóstico histopatológico de melanoma cutâneo do tipo acral-lentiginoso, para que ao final do estudo tivessem pelo menos 5 anos de acompanhamento.

3.4 MICROARRANJOS DE TECIDOS (*Tissue microarray – TMA*)

A partir do corte original corado em hemtoxilina e eosina as áreas neoplásicas são marcadas com caneta e servirão de guia para identificação da área equivalente a ser puncionada no bloco doador. O cilindro de tecido retirado do bloco doador é transferido para o bloco receptor através do uso do equipamento disponível no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer: *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA).

O bloco de TMA foi confeccionado com cilindros de 1mm de diâmetro de 53 amostras de melanomas acrais representados em duplicata. Utilizou-se um cilindro de tecido hepático para orientação inicial de cada seqüência dos casos utilizados. A partir do bloco de TMA foram preparados 100 cortes histológicos seriados em lâminas de vidro com espessura de 3 µm.

3.5 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

Avaliou-se os seguintes marcadores biológicos nas lâminas previamente preparadas com a seguinte seqüência: lâminas 02 e 12 foram utilizadas para reação de imunistoquímica para p53; lâminas 03 e 13 para p21; lâminas 04 e 14 para p16; lâminas 05 e 15 para ciclina D1; lâminas 06 e 16 para pRb e lâminas 07 e 17 para CDK4 . A avaliação imunistoquímica de CDK4 nuclear, foi realizada com pela técnica de fosfatase.

Os anticorpos utilizados foram:

- Anti-ciclina D1 - mouse anti-human -clone DCS-6 Dako cat. M7155, na diluição de 1/300
- Anti-CDK4 - mouse anti-human - Santa Cruz - cat. SC-260, na diluição de 1/100
- Anti p16ink4a - clone DCS-50 1/h4 Oncogene cat NA29, na diluição de 1/40
- Anti pRb -Anticorpo mouse anti-human clone Rb1 M7131 - Dako, na diluição de 1/50
- Anti-p21waf-1(Ab-1), clone EA10- Oncogene cat 0p64T, na diluição de 1/30
- Anti p53- clone D07, DAKO, código m7001, na diluição de 1/100

3.5.1 Protocolo de Reação imunoistoquímica

1. Corte do material em lâminas carregadas (Starfrost) e deixadas por 24 horas em estufa a 60°C.
2. São submetidas a desparafinização em xilol a 60°C por 20 minutos e então xilol à temperatura ambiente por 20 minutos.
3. Posteriormente é realizada a preparação das lâminas através de passagens sucessivas em etanol a cada 30 segundos (100%, 95% e 70%) e então lavagem em água corrente.
4. As lâminas são submetidas à recuperação antigênica pelo calor, utilizando-se panela de pressão (Eterna®, Nigra) e solução tampão citrato 10mM pH 6,0.
5. A seguir, realiza-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução

de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol.), com quatro trocas de 5 minutos cada, seguida de lavagens com solução salina tamponada com fosfatos (PBS - phosphate buffered saline - 10 mM e pH 7,2) por 5 minutos.

6. Incubam-se as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, em tampão PBS, contendo albumina bovina (BSA) a 1% (SIGMA, A9647, USA) e azida sódica (NaN₃) a 0,1%, por 18 horas, a 4°C, em câmara úmida. Após a incubação, lavam-se as lâminas em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada.
7. Inicia-se, então, a incubação das lâminas com o anticorpo secundário biotilado-reagente C (Biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig) do kit StreptABComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (Dako A/S, K492, Denmark) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C e posterior lavagem em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada.
8. Incuba-se, o complexo reagente A (Streptavidin) no título pré-estabelecido de 1:200 e reagente B (Biotinylated Peroxydase) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C e posterior lavagem em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada.
9. As lâminas são incubadas em solução substrato 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 60mg% (Sigma, D-5637 USA), 1ml_ de dimetilsulfóxido (DMSO), 1ml_ de água oxigenada 6%, 100ml_ de PBS, por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

10. Após a observação do desenvolvimento do precipitado castanho, as lâminas são lavadas em água corrente e água destilada por 3 minutos e contracoradas com Hematoxilina de Harris (Merek) por 1 minuto.
11. Segue-se, a desidratação das lâminas em etanol e xilol e subsequente montagem das mesmas para a leitura.
12. As reações são acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado, e controle negativo, realizado pela omissão do anticorpo primário.

3.5.2 Leitura das Lâminas

Utilizou-se na leitura das lâminas o sistema ACIS III para quantificação digital expressa em pixels, através da aquisição de imagens digitalizadas. Os cortes histológicos de TMA são digitalizados e, para cada cilindro correspondente aos casos, através de programa pré-estabelecido, demarca-se 15 áreas. O equipamento avalia a porcentagem, intensidade de células marcadas por campo, apresentando um escore final de marcação para cada caso. Para a análise foi feito um score combinado que constava da intensidade de coloração determinada pela análise de imagem, multiplicada pelo valor da porcentagem de área marcada :

Score final = intensidade * (área marcada / (soma da área marcada e área não marcada))

3.6 ESTUDO POR HIBRIDIZAÇÃO IN SITU POR FLUORESCÊNCIA

3.6.1 Protocolo de Reação de hibridização por fluorescência

Foram quantificados os genes p16, CCDN1 e PTEN, através da metodologia de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). O protocolo utilizado foi o que se segue:

1. Corte do material em lâminas carregadas (Starfrost) e deixadas por 24 horas em estufa a 60°C.
2. Os cortes histológicos com 3 micra de espessura são acondicionados nestas lamínas e submetidos a desparafinização em xilol a 20-25°C por 5 minutos trocando-o e imergindo por mais 5 minutos.
3. Retira-se o excesso de líquido e coloca-se as lâminas em etanol 96% por 2 min, duas vezes.
4. Retira-se o excesso de líquido e coloca-se as lâminas em etanol 70% por 2 min, duas vezes.
5. Retira-se o excesso de líquido e coloca-se as lâminas em tampão.
6. As lâminas são colocadas por 10 minutos na solução de pré-tratamento, pré-aquecida no banho Maria a 96° C.
7. Em seguida deixa-se esfriando por 15 minutos em temperatura ambiente.
8. Após este procedimento, realiza-se 3 passagens no tampão de lavagem, cada uma com duração de 3 minutos.
9. Os cortes são submetidos à digestão enzimática com pepsina,

(concentração não fornecida pelo fabricante) por 25 minutos em temperatura ambiente, lavados com tampão de lavagem (3 trocas, 3 minutos cada passagem), desidratados com etanol em concentrações crescentes (70%, 85% e 96%, 2 minutos cada) e secarão na temperatura ambiente por cerca de 45 minutos.

10. Em seguida realiza-se a aplicação da sonda (10 ul, previamente diluída em tampão de hibridização pelo fabricante) sobre os cortes de tecido, cobertos com lamínula e vedados com material selante. Foram utilizadas as seguintes sondas: **p16ink4** (Vysis LSI p16 - dual color 9p21); **PTEN** (Vysis LSI PTEN - dual color 10q23); **CCND1** (Vysis LSI cyclin D1 -dual color 1q13).
11. As lâminas são colocadas no hibridizador (Hybridizer - DAKO®) e realiza-se a codenaturação da sonda e espécime por 5 minutos a 800 C, seguindo-se de hibridização a 370 C por 16 horas.
12. No segundo dia, os cortes são retirados do hibridizador e, após remoção do selante, colocados por 10 minutos em uma solução *stringent* pré-aquecida a 65° C, lavados com tampão de lavagem (3 passagens de 3 minutos cada), desidratados com passagens em etanol (70%, 85% e 96%, 2 minutos cada) e secarão por cerca de 1 hora em local escuro.
13. A seguir procede-se a contracoloração com 20 ul de DAPI e montagem com lamínula.
14. Após 15 minutos, as lâminas são levadas para observação no microscópio trinocular com fluorescência de mercúrio (Olympus®)

BX41-FL-III), equipado com objetiva de imersão e com os filtros adequados.

As imagens obtidas são capturadas com uma camera colorida digital refrigerada (5.1 megapixel) acoplada ao microscópio acima, usando o programa para análise de imagem Image ProExpress versão 5.1 (Olympus®).

Para a contagem dos sinais foi utilizado o programa AxioVision versão III, sendo considerado resultado normal a presença de dois sinais verdes (centrômeros) e dois sinais vermelhos (cromossomo). Para o gene CCND1 a presença razão de sinais vermelhos/verdes acima de dois foi considerado como amplificação. Para os genes PTEN e p16 analisou-se a deleção, considerada como presente na ausência do sinal vermelho. A deleção homozigótica era detectada pela perda de ambos sinais vermelhos e a deleção heterozigótica pela perda de um sinal. As deleções homo e heterozigóticas foram consideradas separadamente e em conjunto para a confecção da tabela e da análise estatística.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizou-se a análise estatística descritiva dos casos, incluindo frequências absolutas e relativas, medidas de tendência central e de dispersão. Para verificar a associação estatística das variáveis categóricas utilizou-se o teste de associação do qui quadrado.

No estudo da sobrevida global foram considerados os óbitos de qualquer natureza, empregando-se as seguintes metodologias:

Análise univariada: produto limite de Kaplan-Meier; comparação das curvas de sobrevida pelo teste de log-rank;

O tempo de seguimento foi calculado em meses, subtraindo-se a data do diagnóstico da data da última informação disponíveis nos prontuários.

Para todos os testes estatísticos os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CASUÍSTICA E DADOS DEMOGRÁFICOS

A casuística deste estudo foi de cinquenta e três casos sendo quarenta e dois provenientes do Hospital A.C. Camargo e onze casos gentilmente cedidos pelo Prof. Martin Sanguenza (Bolívia). Os principais resultados dos dados demográficos, foram tabulados na Tabela 1. A análise dos dados demográficos demonstrou que a média de idade variou de 31 a 90 anos, com média de 62,68 anos, 27 (50,9%) mulheres. Predominaram caucasianos 28 (61,9%), e apenas 1 caso com histórico familiar de melanoma.

Tabela 1 - Distribuição dos resultados demográficos

Variável	Categorias	Frequência	Percentual	Percentual acumulado
Gênero	Masculino	26	49,1	49,1
	Feminino	27	50,9	100
Etnia	Branco	26	61,9	61,9
	Amarelo	4	9,5	71,4
	Pardo	5	11,9	83,3
	Negro	7	16,7	100
Histórico Familiar	Presente	1	4,0	4,0
	Ausente	24	96,0	96,0

4.2 RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS

As características histopatológicas avaliadas foram tabuladas na Tabela 2. O tamanho da lesão variou de 0,5 a 8,0 cm, com média de 3,2, sendo 86,8% localizados nos pés e 67,9 % ulcerados.

Em relação à profundidade de invasão, a maioria dos casos apresentou-se com nível de Clark de III a V, profundidade média de Breslow de 6,14 mm, sendo 61,5% dos casos acima de 4,0 mm.

O índice mitótico variou de 0 a 22 mitoses, com média de 5,85, estando presente em 83% das amostras, 84,9% com pelo menos uma mitose.

A presença de infiltrado inflamatório peri-tumoral foi observada em 34 (64,2%) casos e o infiltrado inflamatório intra-tumoral em 18 (34,0%) casos, e de regressão em apenas 1 caso.

A disseminação neoplásica evidenciou em 14 (26,4%) amostras, embolização sanguínea e/ou linfática, sendo que 11 (20,8%) casos apresentavam apenas embolização linfática e 3 (5,7%) sanguínea. Houve infiltração peri-neural em 7 (13,2%) dos casos. Satelitose microscópica ocorreu em 6 (11,3%).

Tabela 2 - Distribuição das variáveis histopatológicas.

Variável	Categorias	Frequência	Percentual	Percentual acumulado
Localização	Mão	7	13,2	13,2
	Pé	46	86,8	86,8
Ulceração	Presente	36	67,9	67,9
	Ausente	17	32,1	100
Nível de Clark	Clark I	4	7,7	7,7
	Clark II	5	9,6	17,3
	Clark III	11	21,2	38,5
	Clark IV	13	25,0	63,5
	Clark V	19	36,5	100,0
Espessura de Breslow	< 2mm	7	13,5	13,5
	2 a 4 mm	13	25,0	38,5
	> 4 mm	32	61,5	100,0
Índice Mitótico (número)	0 mitoses	8	15,1	15,1
	1 a 4 mitoses	17	32,1	47,2
	> 4 mitoses	28	52,8	100,0
Índice mitótico (2 categorias)	Ausente	8	15,1	15,1
	Presente	45	84,9	100,0
Infiltrado inflamatório peritumoral	Presente	34	64,2	64,2
	Ausente	19	35,8	100,0
Infiltrado inflamatório intratumoral	Presente	18	34,0	34,0
	Ausente	35	66,0	100,0
Regressão tumoral	Presente	1	1,9	1,9
	Ausente	51	98,1	100,0
Embolização sanguínea e/ou linfática	Presente	14	26,4	26,4
	Ausente	39	73,6	100,0
Embolização linfática	Presente	11	20,8	20,8
	Ausente	42	79,2	100,0
Embolização sanguínea	Presente	3	5,7	5,7
	Ausente	50	94,3	100,0
Infiltração perineural	Presente	7	13,2	13,2
	Ausente	46	86,8	100
Satelitose	Presente	6	11,3	11,3
	Ausente	47	88,7	100,0

4.3 ESTADIAMENTO E SEGUIMENTO

Na avaliação do estadiamento segundo os critério TNM, obteve-se dados apenas no Hospital A.C. Camargo, sendo a maioria de pacientes em estágio T4, N0, M0, 37 (83,2%) acima de estágio clínico 2, com média de seguimento de 32,06 meses e 40,0% de óbitos pela doença.

O tempo de seguimento teve uma média de 32 meses, com 30,2% de óbito pela neoplasia (tabelas 3 e 4)

Tabela 3 - Distribuição de frequências segundo o tempo de seguimento em meses.

N	Válido	37
	Perda	16
Média		32,0670
Mediana		24,9013
Desvio padrão		29,82905
Mínimo		.00
Máximo		128,13

Tabela 4 - Distribuição de frequências segundo o status de seguimento.

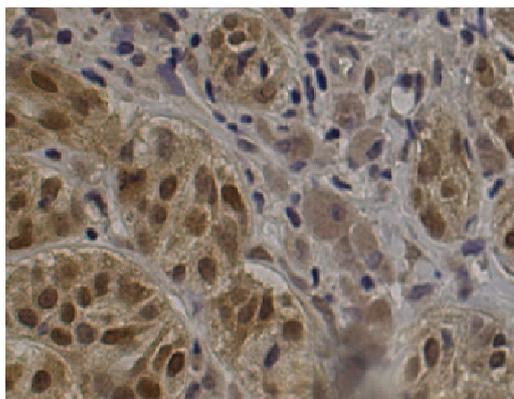
		frequência	Percentual	Percentual válido	Percentual acumulado
Válido	Vivo com doença	8	15,2	20,0	20,0
	Vivo sem doença	14	26,4	35,0	55,0
	Óbito câncer	16	30,2	40	95,0
	Óbito outras causas	2	3,7	5	100
	Total	40	75,5	100,0	
Perda		13	24,5		
Total		53	100,0		

4.4 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

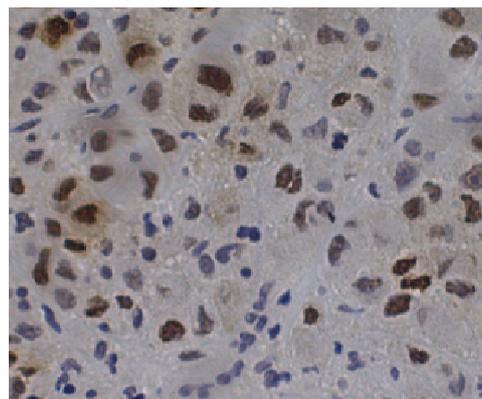
A média dos escores de marcação encontrados para ciclina D1, Cdk4 citoplasmática, Cdk4 nuclear, p16, p53, p21 e pRb respectivamente foram de: 25,89 ; 80,19; 27,9; 70,51; 32,34; 33,71 e 23,96 (Tabela 5 e Figura 3). Foram avaliados apenas os melanomas acima de 1 mm.

Tabela 5 - Distribuição dos valores obtidos pelo score combinado de marcação (ACIS III) para ciclina D1, por técnica imunoistoquímica.

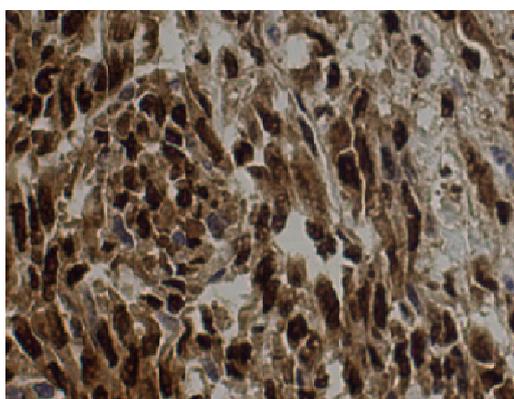
MARCADOR	MÉDIA (SCORE)
pRb	23,96
Ciclina D1	25,89
Cdk4 núcleo	27,90
p21	32,32
p53	32,34
p16	70,51
Cdk4 citoplasma	80,19



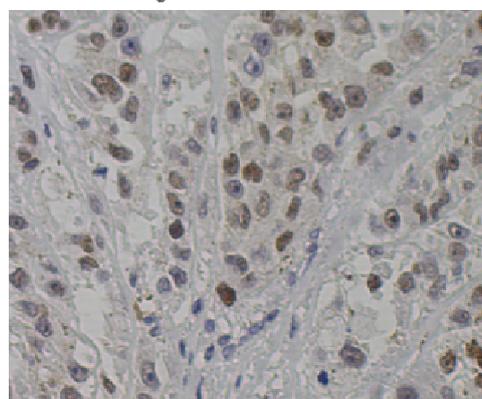
**Anti-CDK4 - Santa Cruz
cat. SC-260, diluição 1/100**



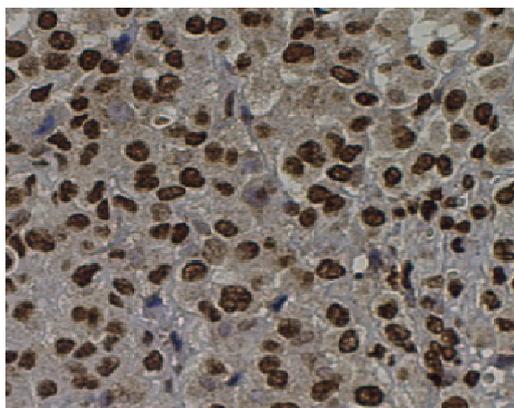
**Anti-p21waf-1, clone EA10,
na diluição de 1/30**



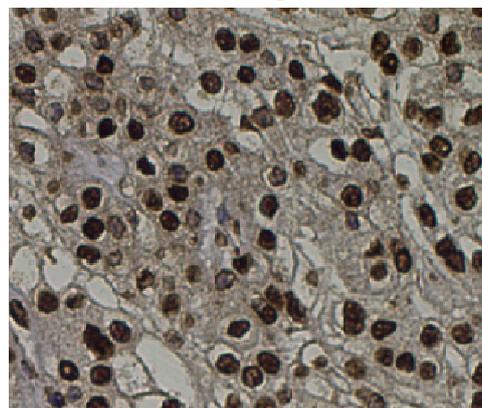
**Anti-ciclina D1 ,clone DCS-6
Dako, diluição 1/300**



**Anti p53- clone D07,
DAKO, diluição 1/100**



**Anti p16ink4a clone
DCS-50,diluição 1/40**



**Anti pRb clone Rb1 M7131
Dako, diluição 1/50**

Figura 3 - Estudo imunoistoquímico

4.5 HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE

As análises para PTEN, p16 e ciclina D1 por técnica de hibridização *in situ* fluorescente evidenciaram 36,6% de deleção para PTEN, sendo 14,6% de deleção homozigótica; 41% de deleção para p16, sendo 25,6% homozigótica; e 28,6% de amplificação para ciclina D1 (Tabelas 5 a 7, Figuras 6 a 8). Foram avaliados apenas os melanomas acima de 1 mm.

Tabela 6 - Distribuição da frequências de deleção de PTEN através da técnica de FISH.

		frequência	Percentual	Percentual válido	Percentual acumulado
Válidos	Deleção homozigótica	6	11,3	14,6	14,6
	Deleção heterozigótica	9	17,0	22,0	36,6
	Sem deleção	26	49,1	63,4	100,0
	Total	41	77,4	100,0	
Perdas		12	22,6		
Total		53	100,0		

Tabela 7 - Distribuição da frequências de deleção de p16 através da técnica de FISH.

		frequência	Percentual	Percentual válido	Percentual acumulado
Válidos	Deleção homozigótica	11	20,8	25,6	25,6
	Deleção heterozigótica	7	13,2	16,3	41,9
	Sem deleção	25	47,2	58,1	100,0
	Total	43	81,2	100,0	
Perdas		10	18,8		
Total		53	100,0		

Tabela 8 - Distribuição de frequências de deleção de CCND1 através da técnica de FISH

		frequência	Percentual	Percentual válido	Percentual acumulado
Válidos	Não amplificado	30	56,6	71,4	71,4
	Amplificado	12	22,6	28,6	100,0
	Total	42	79,2	100,0	
Perdas		11	20,8		
Total		53	100,0		

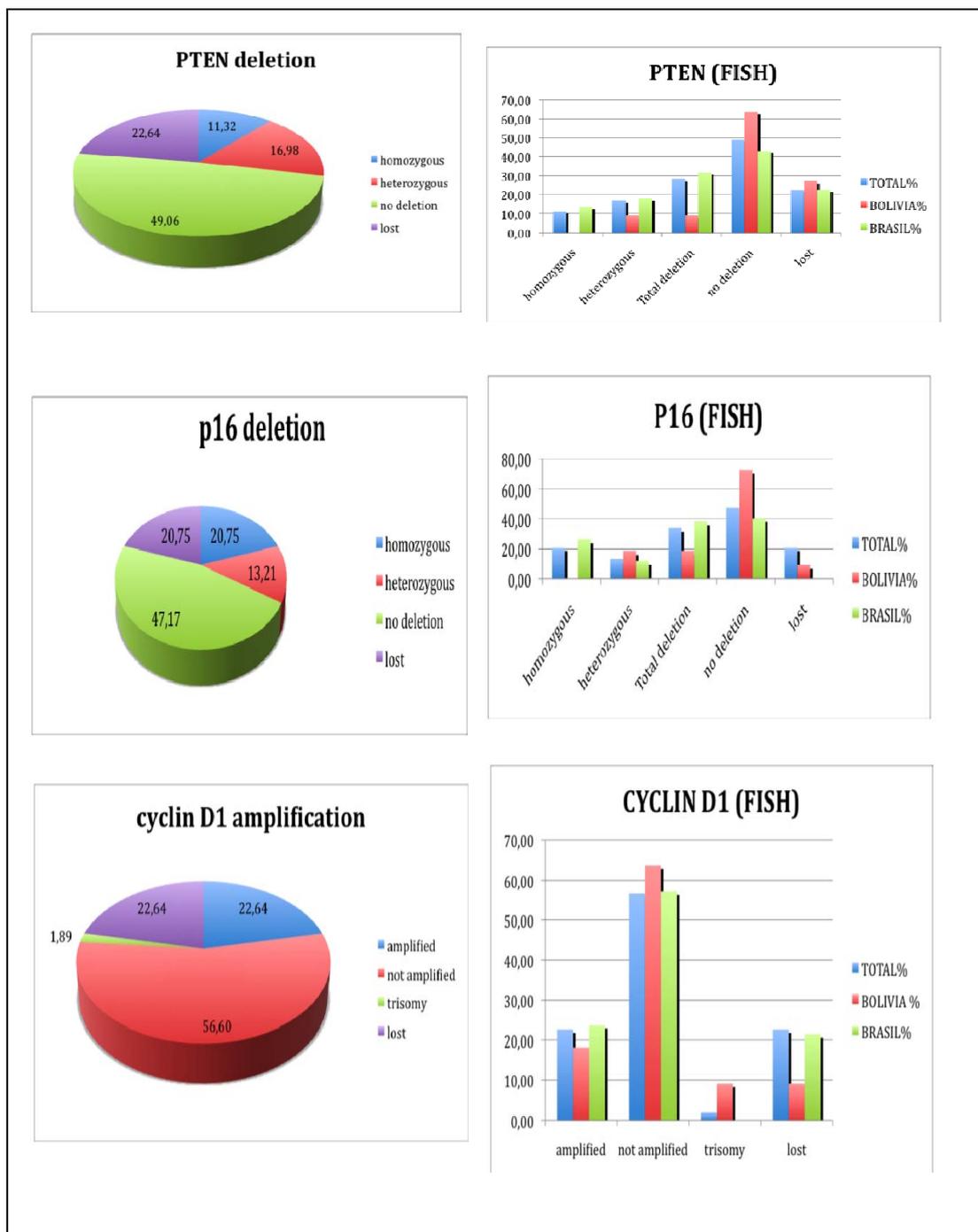


Figura 4 - Estudo por FISH – distribuição de frequências (%) total, em amostras brasileiras e em bolivianas, de deleções dos genes p16 e PTEN e das ampliações do gene CCDN1 (ciclina D1).

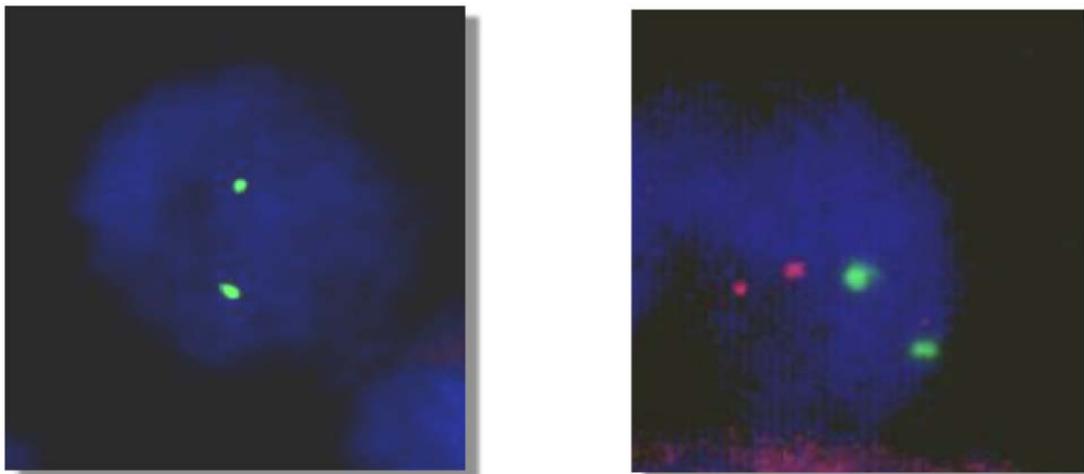


Figura 5 - Exame pela técnica de FISH, demonstrando à esquerda deleção homozigótica de PTEN (Vysis LSI PTEN – dual color 10q23), com perda dos sinais de ambos os cromossomos (em vermelho). Comparar os dois sinais verdes do cromocentro e do locus do PTEN (em vermelho), vistos na imagem da direita.

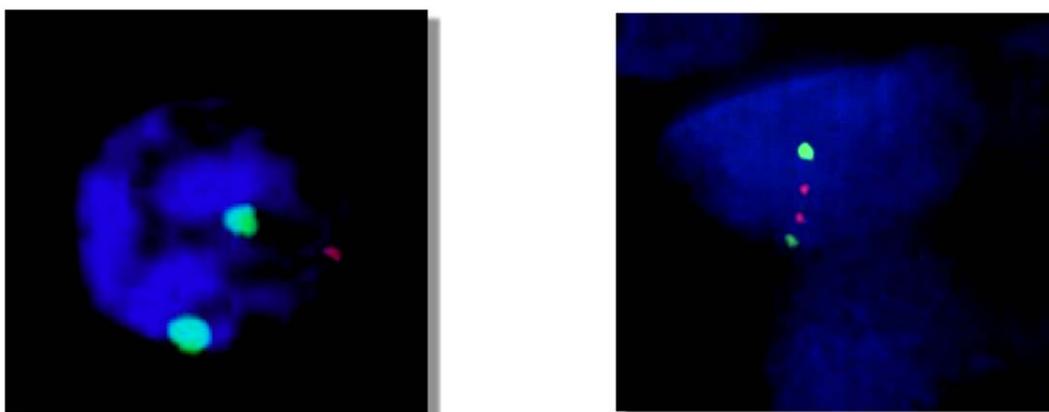


Figura 6 - Exame pela técnica de FISH, demonstrando à esquerda deleção heterozigótica de p16 (Vysis LSI p16 – dual color 9p21), com perda de um dos sinais dos cromossomos (em vermelho). Comparar com os dois sinais verdes do cromocentro e do locus do PTEN (em vermelho), vistos na imagem da direita.

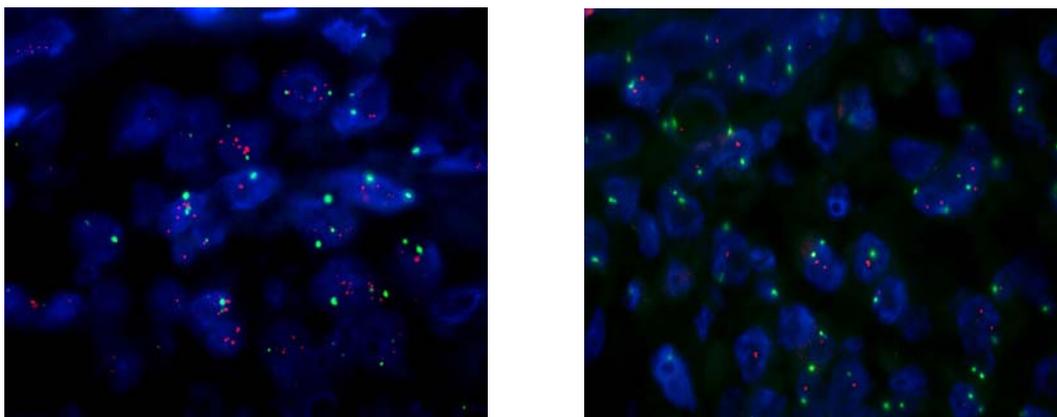


Figura 7 - Exame pela técnica de FISH, demonstrando à esquerda amplificação de CCND1 (Vysis LSI cyclin D1 -dual color 1q13), com amplificação dos sinais dos cromossomos (em vermelho). Comparar com os dois sinais verdes do cromocentro e do locus do CCND1 (em vermelho), vistos na imagem da direita.

4.6 TESTE DE CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS

As correlações significativas, pelo teste de Spearman ($p < 0,05$), ocorreram na associação dos seguintes marcadores entre si: CDK4 nuclear; p21; p53; pRb; ciclina D1 e p16. Notar que apenas as correlações com CDK4 citoplasmático não obtiveram resultados significativos (Tabelas 9 a 14).

Na Tabela 15, as variáveis morfológicas que obtiveram correlação significativa com teste de Spearman ou Mann-Whitney foram ciclina D1 e invasão vascular sangüinea e p53 com invasão vascular sangüinea. Note-se que o índice de Breslow correlacionou-se negativamente com a expressão de CDK4 citoplasmático.

Tabela 9 - Correlações entre CDK4 nuclear e demais marcadores imunoistoquímicos. (S*= significativo. NS= não significativo)

Correlação pelo Teste de Spearman	Significância	Rho	Resultado
CDK4 nuclear x p21	0,000	0,604	S*
CDK4 nuclear x p53	0,000	0,712	S*
CDK4 nuclear x pRb	0,000	0,656	S*
CDK4 nuclear x ciclina D1	0,000	0,576	S*
CDK4 nuclear x CDK4 citoplasma	0,457	-0,106	NS
CDK4 nuclear x p16	0,001	0,438	S*

Tabela 10 - Correlações entre ciclina D1 e demais marcadores imunoistoquímicos (S*= significativo. NS= não significativo)

Correlação pelo Teste de Spearman	Significância	Rho	Resultado
Ciclina D1 x p21	0,000	0,680	S*
Ciclina D1x p53	0,000	0,624	S*
Ciclina D1x pRb	0,000	0,577	S*
Ciclina D1 x CDK4 citoplasma	0,361	0,132	NS
Ciclina D1 x CDK4 nuclear	0,000	0,576	S*
Ciclina D1x p16	0,000	0,521	S*

Tabela 11 - Correlações entre p16 e demais marcadores imunoistoquímicos. (S*= significativo. NS= não significativo)

Correlação pelo Teste de Spearman	Significância	Rho	Resultado
P16 x p21	0,008	0,370	S
P16x p53	0,000	0,641	S
P16x pRb	0,000	0,582	S
P16 x ciclina D1	0,000	0,521	S
P16 x CDK4 citoplasma	0,001	0,438	S
P16x CDK4 nuclear	0,451	0,108	NS

Tabela 12 - Correlações entre p21 e demais marcadores imunoistoquímicos. (S*= significativo. NS= não significativo)

Correlação pelo Teste de Spearman	Significância	Rho	Resultado
P21 x p53	0,000	0,766	S*
P21x pRb	0,000	0,607	S*
P21x ciclina D1	0,000	0,680	S*
P21 x CDK4 nuclear	0,000	0,604	S*
P21 x CDK4 citoplasma	0,653	0,065	NS
P21x p16	0,008	0,370	S*

Tabela 13 - Correlações entre p53 e demais marcadores imunoistoquímicos. (S*= significativo. NS= não significativo)

Correlação pelo Teste de Spearman	Significância	Rho	Resultado
P53 x p21	0,000	0,766	S*
P53 x pRb	0,000	0,771	S*
P53 x ciclina D1	0,000	0,624	S*
P53 x CDK4 nuclear	0,000	0,712	S*
P53 x CDK4 citoplasma	0,933	-0,012	NS
P53 x p16	0,000	0,641	S*

Tabela 14 - Correlações entre pRb e demais marcadores imunoistoquímicos. (S*= significativo. NS= não significativo)

Correlação pelo Teste de Spearman	Significância	Rho	Resultado
PRb x p21	0,000	0,607	S*
PRb x p53	0,000	0,771	S*
PRb x ciclina D1	0,000	0,577	S*
PRb x CDK4 nuclear	0,000	0,656	S*
PRb x CDK4 citoplasma	0,508	0,096	NS
PRb x p16	0,000	0,582	S*

Tabela 15 - Correlações entre variáveis morfológicas e marcadores imunoistoquímicos. (S*= significativo. NS= não significativo)

Variáveis	Significância	Teste	Rho
Ciclina D1 x invasão vascular sangüinea	0,041	Mann-Whitney	NA
P53 x Invasão vascular	0,000	Mann-Whitney	NA
Breslow x CDK4 citoplasma	0,000	Spearman	-0,301

Pelo teste de Kruskal-Wallis não se encontrou correlação entre deleções de PTEN e p16 com a expressão de proteínas do ciclo celular avaliadas por exame imunoistoquímico. O mesmo ocorreu quando se avaliou amplificação de CCND1, utilizando-se o teste de Mann-Whitney.

4.7 SOBREVIDA (KAPLAN-MEYER)

Não houve diferença significativa de sobrevida em 60 meses pela curva de Kaplan-Meier quando comparadas as variáveis demográficas (gênero, cor de pele, nacionalidade, fototipo), clínicas (estádio e TNM), morfológicas (ulceração, Breslow, mitoses, infiltrado inflamatório peri e intratumoral, invasão vascular linfática e sanguínea, satelitose e regressão), imunohistoquímicas (intensidades forte vs fraca de p16, ciclina D1, CDK4, p53, p21, pRb) FISH (CCDN1, p16, PTEN) .

4.8 TESTES COMPARATIVOS ENTRE AMOSTRAS DO BRASIL E BOLÍVIA

Comparando-se a expressão de proteínas do ciclo celular por imunohistoquímica entre amostras do Brasil e Bolívia, não houve diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney, com exceção de CDK4 citoplasmático ($p=0,008$) (Tabela 16).

Tabela 16 - Teste de Mann-Whitney para comparação de intensidades de imunohistoquímica das proteínas do ciclo celular, comparando amostras do Brasil com Bolívia.

Variáveis de comparação imunohistoquímica Brasil vs Bolívia	Significância
P53	0,516
P16	0,159
P21	0,177
PRb	0,658
Ciclina D1	0,825
CDK4 nuclear	0,085
CDK4 citoplasma	0,008*

Não houve diferenças significativas entre frequências de deleção de PTEN e p16, bem como de amplificação de CCND1 quando comparadas amostras do Brasil e Bolívia (Tabela 17).

Tabela 17 - Teste exato de Fisher para comparação entre frequências de deleção de PTEN e p16 e amplificação de CCND1 entre amostras do Brasil e da Bolívia.

Variáveis de comparação Fish Brasil vs Bolívia	Significância (teste exato de Fisher)
PTEN	0,222
P16	0,161
CCND1	1,000

5 DISCUSSÃO

Como em todo o mundo, a incidência de melanoma tem crescido no Brasil, sobretudo na região sul. Em São Paulo este crescimento também foi observado em investigação realizada no Período de 1863 a 1997 (CRIADO et al. 1999). Em estudo na população de Goiânia, realizado entre 1988 e 2000, os coeficientes padronizados médios de incidência do melanoma foram crescentes tanto para homens (6,9% anual - $r^2=0,33$; $p=0,040$) como para mulheres (8,3% anual - $r^2=0,41$; $p=0,019$) (SORTINO-RACHOU et al. 2006).

Entretanto, enquanto em melanomas extensivos superficiais a radiação ultravioleta parece exercer papel preponderante na sua patogênese, esta não parece ter qualquer influência em melanomas acrais.

Nesta casuística, diagnosticou-se melanoma acral em média aos 63 anos de idade, predominou a etnia caucasiana, sem distinção de gênero, sendo preponderante nos pés, como encontrado na literatura mundial.

Dentre as características morfológicas, as lesões foram muito espessas, 61,5% acima de 4,0 mm de profundidade de Breslow e igual proporção com nível de Clark IV ou maior, frequentemente ulcerados (67,9%). Estes dados são provavelmente resultantes de diagnóstico muito tardios, e reforçam a necessidade de conscientização do médico para o exame locoregional sistemático em populações de risco, como por exemplo na região nordeste onde a incidência deste tipo de neoplasia é mais alta

(BRANDÃO et al. 2005).

Esta característica refletiu-se no estadiamento dos pacientes, em sua maioria avançados. De fato, 83,2% dos pacientes encontravam-se em estadio T4, como se viu acima, ulcerados.

Entretanto ao observar a sobrevida em cinco anos, a taxa de sobrevida foi alta (65,2%), comparando-se com 45% de sobrevida encontrada na literatura para pacientes T4b (> 4 mm de Breslow, ulcerados).

No entanto, ao estabelecer-se as curvas de sobrevida na amostra, não foi possível estabelecer uma correlação com profundidade de Breslow, bem como dados de estadiamento. O índice de Breslow é o fator de maior impacto na sobrevida de pacientes com melanoma. Considerando que foram analisados apenas os casos incluídos no TMA, sendo todos melanomas acima de 1,0 mm, é provável que tenha sido afetada a análise de sobrevida através dos parâmetros morfológicos. Justifica-se de certa forma, que não houve diferenças significativas de sobrevida em 60 meses pela curva de Kaplan-Meier quando comparadas as variáveis clínicas (estádio e TNM) e morfológicas (ulceração, Breslow, mitoses, infiltrado inflamatório peri e intratumoral, invasão vascular linfática e sanguínea, satelitose e regressão).

A avaliação imunoistoquímica através do programa ACIS III constitui um avanço em relação à avaliação semiquantitativa, uma vez que permite estabelecer a intensidade e área marcada pelo cromógeno em número de pixels, estabelecendo números que podem ser analisados com ferramentas estatísticas mais precisas. Aqui também não houve correlação da intensidade (fraca ou forte estabelecida na curva ROC para p16, ciclina D1,

CDK4, p53, p21, pRb), com sobrevida em nenhum dos marcadores imunohistoquímicos.

Entretanto, ao examinar-se os testes de Spearman entre escores de expressão imunohistoquímicas dos marcadores, observou-se como visto na Tabela 33, correlação direta significativa entre todas proteínas do ciclo celular, com níveis de significância muito altos. CDK4 citoplasmático não correlacionou-se com as outras variáveis imunohistoquímicas. Estes resultados indicam que a avaliação através do programa ACIS III são consistentes com os dados de literatura. Quando se seleciona pares de proteína com índices altos de correlação Rho (acima de 0,7), ressaltam-se p53 e CDK4 nuclear, p53 e p21, p53 e pRb. É conhecida a relação entre p53 e p21, sendo esta última ativada pela primeira ao desencadear-se a parada do ciclo celular em G2, quando p14ARF é acionado na leitura alternativa do gene CDKN2A (CHANA et al. et al. 2000).

Estudo feito em melanomas extensivos superficiais encontrou expressão aumentada de p53, CDK4 e p21 em lesões acima de 1 mm de profundidade, portanto em neoplasias mais avançadas como encontrado na presente amostra. Também foi evidenciado que CDK4 esteve mais expresso em melanomas primários comparado a melanomas metastáticos (DE SÁ et al. 2009).

Os achados do presente estudo com o melanoma acral parecem corroborar os resultados anteriores. É possível que as proteínas envolvidas no ciclo celular participem da gênese de melanomas. CURTIN (2005), ao estudar o perfil cromossômico dos melanomas, observou em melanomas

acrais, uma maior percentagem de casos com mutação do gene *CCDN1* (da ciclina D1), bem como de *PTEN*. Entre outros achados, a presença de p53 e Ciclina D1 correlacionou-se com invasão vascular ($p=0,007$ e $0,041$ respectivamente). HUSSEIN et al. (2003), estudando melanomas uveais encontraram correlação entre a hiperexpressão imunohistoquímica de p53 e invasão extraocular e vascular, enquanto TOSCHI et al. (2000), ao estudar linhagens de células de melanoma transfectadas com p53 selvagem através de vetor de adenovirus recombinante (AdCMV. p53), observaram redução da capacidade de invasão atribuída a redução dos níveis de metaloproteinase 2.

KALEEM et al. (2000), relatou maior frequência de expressão da proteína p53 nos melanomas que se encontravam em fase vertical de crescimento. HA et al. (2008) e HAFERKAMP et al. (2009), fazem uma revisão dos mecanismos de senescência dos melanócitos e correlaciona as alterações de p53 e pRb com este mecanismo e o desenvolvimento do melanoma. As alterações nas vias de p53, pRB, ciclina D1 e p16 parecem ser necessárias para o desenvolvimento e progressão do melanoma (PALMIERI et al. 2009). Embora não tenhamos observado correlação com sobrevida, esta associação poderá ter relevância ao se estudar um número maior de pacientes portadores de melanoma.

O estudo do gene *PTEN* pela técnica de FISH evidenciou deleção homozigótica em 14,6% e heterozigótica em 22,0% das amostras válidas, perfazendo um total de 36,6% de deleções. CURTIN et al. (2003) encontraram correlação entre a deleção de *PTEN* e mutações em *BRAF*,

indicando que a via PI3K é frequente sítio de alterações no melanoma, dados similares aos aqui relatados.

A deleção de PTEN é descrita presente em várias neoplasias cutâneas, entre elas o melanoma, e sua perda é considerada como fator de desenvolvimento desta neoplasia. Mutações no gene PTEN relacionam-se tanto com a exposição a radiação ultra-violeta, ocasionando mutações diretas, como alterações por indução pelo stress oxidativo (MING et al. 2009).

O estudo do gene p16 pela técnica de FISH evidenciou deleção homozigótica em 25,6% e heterozigótica em 16,3% das amostras válidas, perfazendo um total de 41,9% de deleções. Entretanto, não houve correlação com a expressão imunistoquímica tanto de p16 quanto com as demais proteínas do ciclo celular. Desta forma, embora o índice de deleções seja elevado, não se encontrou evidências de que a perda de p16 tenha implicações funcionais. A proteína p16 é produto do gene CDKN2A, sendo este reconhecido como um dos genes mutados mais encontrados em melanoma, o que ocorre precocemente em acrais-lentiginosos (CHANA et al. 2000; HSIEH et al. 2009).

O estudo do gene CCND1 pela técnica de FISH evidenciou amplificação em 28,6% das amostras válidas. Em estudo pela técnica de CGH, CURTIN et al. (2003) observaram que o aumento de número de cópias de CCND1 se relacionavam com mutações de BRAF.

Técnicas moleculares para estabelecimento de lesões melanocíticas atípicas, cuja morfologia não permita definir se a lesão é benigna ou maligna

vêm sendo estudadas. A utilização através da técnica de FISH, de um perfil de gênico com sondas de DNA para PTEN, CCND1 e p16 combinadas, pode indicar um limiar de mutações acima da qual o diagnóstico de melanoma seria estabelecido. Em nosso estudo, pudemos estabelecer o perfil cromossômico dos melanomas acrais, que poderiam ser aplicados ao diagnóstico de melanomas, para posterior validação em uma coorte de pacientes cujo diagnóstico é equivoco.

Os fatores demográficos, anatomopatológicos, de estadiamento, imunoistoquímicos, FISH (CCDN1, p16, PTEN) não influenciaram a sobrevida dos pacientes. Novos estudos devem ser feitos com casuística maior e avaliação de novos genes para se determinar quais fatores poderiam influenciar na sobrevida do melanoma

6 CONCLUSÃO

- 1 Predominaram melanomas nos pés, sendo a maioria dos casos muito profundos, acima de 4 mm de espessura de Breslow, indicando um diagnóstico tardio da doença.
- 2 Foram encontradas deleções de PTEN (27%), p16 (33%) e amplificação de CCND1 (22%).
- 3 Houve correlação de expressão de proteínas do ciclo celular entre si,
- 4 Não houve correlação entre a expressão de imunistoquímica das proteínas estudadas com deleções de PTEN e p16 e ampliações de CCND1
- 5 Houve correlação entre as expressões imunistoquímicas de Ciclina D1 e invasão vascular e p53 e invasão vascular.
- 6 Os achados acima podem ter significado para modificar a abordagem diagnóstica de pacientes portadores de melanomas acrais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd Elmageed ZY, Gaur RL, Williams M, et al. Characterization of coordinated immediate responses by p16INK4A and p53 pathways in UVB-irradiated human skin cells. **J Invest Dermatol** 2009; 129:175-83.

Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. **Science** 1990; 249:912-5.

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

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

Bastian B.C., Kahani-Sabet M., Hamm H, et al. Gene Amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. **Cancer Res** 2000; 60:1968-73.

Battisti R, Nunes DH, Lebsa-Weber A, Schweitzer LC, Sgrott I. Avaliação do perfil epidemiológico e da mortalidade dos pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo primário no município de Florianópolis - SC, Brasil. **An Bras Dermatol** 2009; 84:335-42.

Bhatt KV, Spofford LS, Aram G, McMullen M, Pumiglia K, Aplin AE. Adhesion control of cyclin D1 and p27Kip1 levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling. **Oncogene** 2005; 24:3459-71.

Bianchi S, Calzolari A, Giannelle E, Giordano A, Zampi G. Expression of retinoblastoma protein in human breast cancer: an immunohistochemical study. **Pathologica** 1994; 86:146-9.

Bradfort PT, Goldenstein AM, McMastaer ML, Ticker AM. **Arch Dermatol** 2009; 45:427-34.

Brandão MAR, Souza FFA, Zanvettor P. Clinical, Demographic and histopathological evaluation of 529 melanoma cases diagnosed in the state of Bahia – Brazil. **Appl Cancer Res Suppl** 2005; 1:9-10.

Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. **Proc Nat Acad Sci** 1991; 88:10124-8.

Bütter A, Hui T, Chapdelaine J, Beaunoyer M, Flageole H, Bouchard S. Melanoma in children and use sentinel lymph node biopsy. **J Pediatr Surg** 2005; 40:797-800.

Buzaid AC, Ross MI, Balch CM, et al. Critical analysis of the current American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal a new staging system. **J Clin Oncol** 1997; 15:1039-97.

Byers HR, Bhawan J. Pathologic parameters in the diagnosis and prognosis of primary cutaneous melanoma. **Hematol Oncol Clin North Am** 1998; 12:717-35.

Cascinelli N, Zurrida S, Galimberti V, et al. Acral Lentiginous Melanoma: a histological type without prognostic significance; **J Dermatol Surg Oncol** 1994; 20:817-22.

Chana JS, Grover R, Wilson GD, et al. An analysis of p16 tumor suppressor gene expression in acral lentiginous melanoma. **Br J Plastic Surg** 2000; 53:46-50.

Chang JW, Yeh KY, Wang CH, et al. Malignant melanoma in Taiwan: a prognostic study of 181 cases. **Melanoma Res** 2004; 14:537-41.

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

Cook MG, Spatz A, Bröcker EB, Ruitter DJ. Identification of histological features associated with metastatic potential in thin (<1.0 mm) cutaneous melanoma with metastases. A study on behalf of the EORTC Melanoma Group. **J Pathol** 2002; 197:188-93.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam; 2000. Neoplasia; p.281-356.

Coupland SE, Anastassiou G, Stang A. The prognostic value of cyclin D1, p53 and MDM2 protein expression on uveal melanoma. **J Pathol** 2000; 191:120-6

Criado PR, Vasconcelos C, Sittart JAS, et al. Melanoma maligno cutâneo primário: Estudo retrospectivo de 1963 a 1997 no Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo. **Rev Ass Med Bras** 1999; 45:157-62.

Cress RD, Holly EA. Incidence of cutaneous melanoma among non - Hispanic Whites, Hispanics, Asians, and Blacks: an analysis of California Cancer Registry data, 1988 – 93. **Cancer Causes Control** 1997; 8:246-52.

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

Dahl C, Guldborg P. The genome and epigenome of malignant melanoma. **APMIS** 2007; 115:1161-76.

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

Demirkan NC, Kessen Z, Akdag B, Larue L, Delmas V. The effect of the sun on expression of b-catenin, p16 and cyclin d1 proteins in melanocytic lesions. **Clin Exper Dermatol** 2007; 32:733-9.

Dumaz N, Drougard C, Sarasin A, Daya-Grosjean L. Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. **Proc Nat Acad Sci** 1993; 90:10529-33.

Elder De, Gimotty PA, Guerry D. Cutaneous melanoma: estimating survival and recurrence risk based on histopathologic features. **Dematol Ther** 2005; 18:369-85.

Fecher AL, Staci D, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM. Toward a molecular classification of melanoma. **J Clin Oncol** 2007; 25:1606-20.

Flockhart RJ, Armstrong JL, Reynolds NJ, Lovat PE. NFAT signalling is a novel target of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. **Br J Cancer** 2009; 101:1448-55.

Florell SR, Boucher KM, Garibotti G, et al. Population-based analysis of prognostic factors and survival in familial melanoma. **J Clin Oncol** 2005; 23:7168-77.

Florenes VA, Holm R, Fodstad O. Accumulation of p53 protein in human malignant melanoma. Relationship to clinical outcome. **Melanoma Res** 1995; 5:183-7.

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

Goel VK, Lazr AJF, Warnek CL, Redstonen MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in Primary Cutaneous Melanoma. **J Invest Dermatol** 2006; 126:154-60.

Greer RO Jr, Said S, Shroyer KR, Marileila VG, Weed SA. Overexpression of cyclin D1 and cortactin is primarily independent of gene amplification in salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Oral Oncol** 2007; 43:735-41.

Griinwald V, DeGraffenried L, Russel D, Friedrichs WE, Ray RB, Hidalgo M. Inhibitors of mTorreverse doxorubicin ressitance conferred by PTEN status in prostate cancer cells. **Cancer Res** 2002; 62:6141-45.

Guitart J, Lowe L, Piepkorn M, et al. Histological characteristics of metastasizing thin melanomas: a case-control study of 43 cases. **Arch Dermatol** 2002; 138:603-7.

Ha L, Merlino G, Sviderskaya EV. Melanomagenesis: overcoming the barrier of melanocyte senescence. **Cell Cycle** 2008; 7:1944-8.

Haas-Kogan D, Shaley N, Wong M, Mills G, Yount G, Stroke D. Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor supressor PTEN/MMAC. **Curr Biol** 1998. 8:1195-8.

Haferkamp S, Tran SL, Becker TM, Scurr LL, Kefford RF, Rizos H. The relative contributions of the p53 and pRb pathways in oncogene-induced melanocyte senescence. **Ageing** 2009; 1:542-56.

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

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

Hoolstein M, Sidransky D, Volgestein B, Harris CC. P53 mutations cancers. **Science** 1991; 253:49-53.

Hsieh R, Firmiano A, Sotto MN. Expression of p16 protein in acral lentiginous melanoma. **Int J Dermatol** 2009; 48:1303-7.

Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. **J Pathol** 2003; 199:275-88.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas/2010 incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Ishiara K, Salda R, Otsuka F, Yamazaki M. Statistical profiles of malignant melanoma and other skin cancers in Japan: 2007 update. **Int J Clin Oncol** 2008; 13:33-41.

Kageshita T, Hamby CV, Hirai S, Kimura T, Ono T, Ferrone S. Differential clinical significance of alfa-v-beta-3 expression in primary lesions of acral lentiginous melanoma and of other melanoma histotypes. **Int J Cancer (Pred Oncol)** 2000; 89:153-9.

Kaleem Z, Lind AC, Humphrey PA. Concurrent Ki-67 and p53 immunolabeling in cutaneous melanocytic neoplasms: an adjunct for recognition of the vertical growth phase in malignant melanomas?. **Mod Pathol** 2000; 13:217-22.

Kansta MB, Onyekwere O, Sidransky D, Volgestein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Res** 1991; 51:6304-11.

Kido K, Sumimoto H, Asada S, et al. Simultaneous suppression of MITF and BRAF V600E enhanced inhibition of melanoma cell proliferation. **Cancer Sci** 2009; 100:1863-9.

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

Kuchelmeister C, Schaumburg-Lever G, Garbe C. Acral cutaneous melanoma in caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients. **Br J Dermatol** 2000; 143:275-80.

Lane DP. P53, guardian of the genome. **Nature** 1992; 358:15-6

Langley RGB, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Clinical characteristics. In: Balch AM, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ, editors. **Cutaneous melanoma**. 3 ed. Missouri: QMP; 1998. p.90.

Lefevre M, Vergier B, Balme B, et al. Relevance of vertical growth pattern in thin level II cutaneous superficial spreading melanomas. **Am J Surg Pathol** 2003; 27:717-24.

Levine AJ. p53, the cellular gate keeper for growth and division. **Cell** 1997; 88:323-31

Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. **Cell Sci** 2000; 113:1661-70.

Li W, Sanki A, Karim RZ, et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. **Pathology** 2006; 38:287-301.

Lipsker D, Engel F, Cribier B, Velten M, Hedelin G. Trends in melanoma epidemiology suggests three different types of melanoma. **Br J Dermatol** 2007; 157:338-43

Ma J, Martin JD, Zhang H, et al. A second p53 binding site in the central domain of Mdm2 is essential for p53 ubiquitination. **Biochemistry** 2006; 45:9238-45

Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:1878-90.

Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler HP. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. **Nature** 1986; 319:783-4.

Ming M, He YY. PTEN: new insights into its regulation and function in skin cancer. **J Invest Dermatol** 2009; 129:2109-12.

Morton DL, Davtyan DG, Wanek LA, Foshag LJ, Cochran AJ. Multivariate analysis of the relationship between survival and the microstage of primary melanoma by Clark level and Breslow thickness. **Cancer** 1993; 71:3737-43.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse tumor types. **Nature** 1989; 342:705-8.

Noonan FP, De Fabo EC. UVB and UVA initiate different pathways to p53-dependent apoptosis in melanocytes. **J Invest Dermatol** 2009; 129:1608-10.

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

Pantaleão L, Rochael MC. Estudo da espessura da regressão como fator prognóstico nos melanomas cutâneos finos. **J Bras Patol Med Lab** 2008; 44:381-9.

Péres-Tenorio G, Stal O. Activation of AKT/PBK in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. **Br J Cancer** 2002; 86:540-5.

Pezzolesi MG, Zbuk KM, Waite KA, Eng C. Comparative genomic and functional analyses reveal a novel cis-acting PTEN regulatory element as a highly conserved functional E-box motif deleted in Cowden syndrome. **Hum Molecular Genet** 2007; 16:1058-71.

Phan A, Touzet S, Dalle S, Ronger-SavleS, Balme B, Thomas L. Acral lentiginous melanoma: histopathological prognostic features of 121 cases. **Br J Dermatol** 2007; 157:311-8.

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

Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. **Cell** 1995; 83:993-1000.

Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, et al. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:2110-5.

Richard MA, Grab JJ, Avril MR. Delays in diagnosis and melanoma prognosis: the role of patients. **Int J Cancer** 2000; 89:271-9.

Ridgeway CA, Hieken TJ, Ronan SG, et al. Acral lentiginous melanoma; **Arch Surg** 1995; 130:88-92.

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

[SEER] Surveillance Epidemiology and end Results. **SEER Cancer Statistics Review 1975-2000**. Available from: <URL:http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/results_merged/topic_topfifteen.pdf> [2010 ago 12]

Shaw PH. The role of p53 in cell cycle regulations. **Pathol Res Pract** 1996; 192:669-75.58.

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

Sini MC, Manca A, Cossu A, et al. Molecular alterations at chromosome 9p21 in melanocytic naevi and melanoma. **Br J Dermatol** 2008; 158:243-50.

Stahl JM, Sharma A, Cheung M, et al. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. **Cancer Res** 2004; 64:7002–10.

Sortino-Rachou AM, Curado MP, Latorre MRDO. Melanoma cutâneo: estudo de base populacional em Goiânia, Brasil, de 1988 a 2000. **An Bras Dermatol** 2006; 81:449-55.

Srivastava S, Zou Z, Pirollo K, Blattner W, Chang EH. Germ-line transmission of a mutated p53 in a cancerprone family with Li Fraumeni Syndrome. **Nature** 1990; 348:747-9.

Stalkup JR, Orengo IF, Katia R. Controversies in acral lentiginous melanoma. **Dermatol Surg** 2002; 28:1051-9.

Stott FJ, Bates S, James MC, et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. **EMBO J** 1998; 17:5001-14.

Swan MC, Hudson DA. Malignant melanoma in South Africans of mixed ancestry: a retrospective analysis. **Melanoma Res** 2003; 13:415-9.

Takahashi T, Nau MM, Chiba I, et al. P53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. **Science** 1989; 246:491-4.

Thörn M, Pontén F, Bergström R, Sparén P, Adami HO. Clinical and histopathologic predictors of survival in patients with malignant melanoma: a population based study in Sweden. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:761-9.

Toschi E, Rotta R, Antonini A, Medillo G, Capogrossi MC. Wild-type p53 gene transfer inhibits invasion and reduces matrix metalloproteinase-2 levels in p53-mutated Human melanoma cells. **J Invest Dermatol** 2000; 114:1188-94.

Uribe P, Wistuba II, Gonzalez S. BRAF mutation: a frequent event in benign, atypical, and malignant melanocytic lesions of the skin. **Am J Dermatopathol** 2003; 25:365-70.

Veierod MB, Weiderpass E, Thorn M, et al. A prospective study of pigmentation, sun exposure, and risk of cutaneous malignant melanoma in women. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:1530-8.

Vries E, Bray FI, Coebergh JW, Parkin DM. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in Western Europe and decreases in Scandinavia. **Int J Cancer** 2003; 107:119-26.

Vries E, Boniol M, Doré JF, Coebergh JW; EURO CARE working group. Lower incidence rates but thicker melanomas in Eastern Europe before 1992: a comparison with Western Europe. **Eur J Cancer** 2004; 40:1045-52.

Wang SS, Cozen W, Severson RK, et al. Cyclin D1 splice variant and risk for non-Hodgkin lymphoma. **Hum Genet** 2006; 120:297-300.

[WHO] World Health Organization. **Pathology and Genetics of Skin Tumors**. Lyon: IARC PRESS; 2006.

Yamamoto M, Takahashi H, Saitoh K, Horikoshi T, Takahashi M, Watanabe W. Expression of the p53 protein in malignant melanomas as a prognostic indicator. **Arch Dermatol** 1995; 287:146-51.

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

Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. **Nature** 1994; 372:773-6.