

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**JULIANA ELIZABETH JUNG**

**EXPRESSÃO DOS GENES BRAF E C-KIT E SUA CORRELAÇÃO COM  
FATORES PROGNÓSTICOS EM MELANOMAS CUTÂNEOS**

**CURITIBA  
2010**

**JULIANA ELIZABETH JUNG**

**EXPRESSÃO DOS GENES BRAF E C-KIT E SUA CORRELAÇÃO COM  
FATORES PROGNÓSTICOS EM MELANOMAS CUTÂNEOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de  
Ciências da Saúde, Universidade Federal  
do Paraná, como requisito parcial à  
obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto  
Matias

**CURITIBA  
2010**

Ficha Catalográfica

Jung, Juliana Elizabeth

Expressão dos genes BRAF e c-Kit e sua correlação com fatores prognósticos em melanomas cutâneos / Juliana Elizabeth Jung. – Curitiba, 2010

93f. : il.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Dissertação (doutorado) – Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná,

1. Melanoma cutâneo 2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) I. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, orientador, meu reconhecimento pela contribuição e interesse em minha formação acadêmica.

À Dr.<sup>a</sup> Almut Böer, pela amizade e exemplo profissional, minha gratidão pelo apoio na realização deste estudo.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Molecular, Dermatologikum Hamburg e do Hospital Erasto Gaertner, pela dedicação e colaboração em muitas etapas desta pesquisa.

## RESUMO

Dados clínicos e histológicos de melanomas cutâneos primários fornecem informações prognósticas úteis, porém o curso clínico de determinada lesão é imprevisível. Fatores adicionais para prever sua evolução são necessários e técnicas de biologia molecular permitem a identificação de marcadores moleculares que podem ter valor prognóstico em melanomas. O presente estudo avaliou mutações BRAF e c-Kit em 96 espécimens cirúrgicos de melanomas cutâneos primários e 15 lesões metastáticas correspondentes em uma série de pacientes brasileiros, através da técnica TaqMan Real-Time polymerase chain reaction (PCR) e correlacionou estes dados com fatores prognósticos clínicos e anatomopatológicos atualmente conhecidos. Esta análise não identificou mutações no gene c-Kit e mostrou uma frequência baixa de mutações BRAF em melanomas cutâneos primários (39%) e metastáticos (40%). Essas mutações ocorreram em estágio inicial durante a progressão da neoplasia e não estiveram envolvidas na transição de melanomas finos ( $\leq 1$ mm) para grossos ( $> 1$ mm). Essas mutações estavam presentes em pacientes mais jovens e se correlacionaram com o padrão de exposição solar dos pacientes estudados, mas não houve correlação com nenhum fator prognóstico histológico ou sobrevida global dos mesmos. A identificação de ambas as mutações BRAF e c- kit não servem como indicadores de prognóstico na população brasileira. Além disso, a baixa frequência de mutações BRAF encontrada neste estudo nos faz questionar se esta mutação realmente tem um papel chave na patogênese do melanoma.

Palavras-chave: Melanoma cutâneo. Fatores prognósticos. Reação em cadeia da polimerase. BRAF. c-Kit.

## ABSTRACT

Clinical and histopathological data of a primary cutaneous melanoma provide useful prognostic information; however, the clinical course of an individual neoplasm is currently unpredictable. Additional factors to predict its evolution are necessary and molecular biology techniques have permitted the identification of molecular markers which may be of prognostic value in malignant melanoma. The present study evaluated BRAF and c-Kit gene mutations in 96 surgical specimens of primary cutaneous melanoma and 15 corresponding metastasis in a series of Brazilian patients using the TaqMan Real-Time polymerase chain reaction (PCR) assays and correlated these data with clinical and histopathological prognostic factors currently known. The results showed no c-Kit gene mutations and a relative low frequency of BRAF mutation in primary (39%) and metastatic (40%) melanomas. The mutations arose at an early stage during melanoma progression and were not involved in the transition of thin ( $\leq 1$ mm) to thick melanomas ( $> 1$ mm). BRAF mutation was related to younger age of patients and to the pattern of sun exposure but there was no correlation with any histological prognostic factor or overall survival. The identification of both, BRAF and c-Kit mutation, do not serve as indicators of prognosis in the Brazilian population. Moreover, the relatively low frequency of BRAF mutations calls into question whether this mutation really plays a key role in pathogenesis of melanoma. In fact, there must be alternative genetic pathways in development melanoma.

Key words: Cutaneous melanoma. Prognostic Factors. Polymerase Chain Reaction. BRAF. c-Kit

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - LOCALIZAÇÃO DOS MELANOMAS NOS PACIENTES DO GRUPO I.....	28
GRÁFICO 2 - FREQUÊNCIA DOS MELANOMAS DE ACORDO COM A EXPOSIÇÃO AO SOL NOS PACIENTES DO GRUPO I.....	28
GRÁFICO 3 - FREQUÊNCIA DE ULCERAÇÃO E REGRESSÃO OBSERVADAS NO GRUPO I.....	29
GRÁFICO 4 - TEMPO DE ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES DO GRUPO I.....	30
GRÁFICO 5 - LOCALIZAÇÃO DOS MELANOMAS NOS PACIENTES DO GRUPO II.....	30
GRÁFICO 6 - FREQUÊNCIA DOS MELANOMAS DE ACORDO COM A EXPOSIÇÃO A SOL NOS PACIENTES DO GRUPO II.....	31
GRÁFICO 7 - FREQUÊNCIA DE ULCERAÇÃO, REGRESSÃO E SATELITOSE OBSERVADAS NO GRUPO II.....	32
GRÁFICO 8 - TEMPO DE ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES DO GRUPO II.....	33
GRÁFICO 9 - ASSOCIAÇÃO ENTRE MUTAÇÃO BRAF E PROGNÓSTICO NOS MELANOMAS FINOS.....	35
GRÁFICO 10 - ASSOCIAÇÃO ENTRE MUTAÇÃO BRAF E PROGNÓSTICO NOS MELANOMAS GROSSOS.....	35
GRÁFICO 11 - FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO BRAF NOS GRUPOS I E II.....	36
GRÁFICO 12 - PROBABILIDADE DE MUTAÇÕES BRAF DE ACORDO COM A IDADE.....	37
GRÁFICO 13 - DISTRIBUIÇÃO DOS MELANOMAS NOS GRUPOS COM E SEM MUTAÇÕES EM RELAÇÃO A EXPOSIÇÃO AO SOL.....	38

GRÁFICO 14 - DISTRIBUIÇÃO DO NÍVEL DE CLARK NOS GRUPOS COM E SEM MUTAÇÕES.....	38
GRÁFICO 15 - FREQUÊNCIA DE ULCERAÇÃO, REGRESSÃO E SATELITOSE OBSERVADAS NOS GRUPOS COM E SEM MUTAÇÕES.....	39
GRÁFICO 16 - ASSOCIAÇÃO ENTRE EVOLUÇÃO CLÍNICA E MUTAÇÕES BRAF.....	40
GRÁFICO 17 - CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE TODOS OS PACIENTES COM MELANOMA CUTÂNEO.....	41
GRÁFICO 18 - CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES DO GRUPO I E II.....	42
GRÁFICO 19 - CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES COM E SEM MUTAÇÃO BRAF.....	43



## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES DO GRUPO II.....	32
TABELA 2 - MUTAÇÕES BRAF EM LESÕES PRIMÁRIAS E SUAS METÁSTASES CORRESPONDENTES.....	34

## LISTA DE SIGLAS

ACS - American Cancer Society  
A - Adenina  
BRAF - v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1  
C - Citosina  
CGA - Campos de Grande Aumento  
DNA - Deoxyribonucleic acid  
ERK - Extracellular Regulated Kinase  
G - Guanina  
INCA - Instituto Nacional do Câncer  
MAPK - Mitogen-Activated Protein Kinase  
MEK - Methyl Ethyl Ketone  
MGF - Mastocyte Growth Factor  
NCBI/BLAST - National Center for Biotechnology Information/ Basic Local  
Alignment Search Tool  
NCI - National Cancer Institute  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
PCR - Polymerase Chain Reaction  
RGP - Radial Growth Phase  
Ser - Serina  
T - Tiamina  
Thr - Treonina  
Tyr -Tirosina  
UV - Ultraviolet  
VGP - Vertical Growth Phase

## LISTA DE ABREVIATURAS

et al. - et alli  
fig. - figura  
For - forward  
inf. - inferior  
min – minutos  
mut. - mutação  
n. – número  
NA – não avaliável  
p. – página  
ref. - referência  
Rev - reverse  
seg - segundos  
sup. - superior  
v. – volume

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C - graus Celsius  
mm<sup>2</sup> - milímetro quadrado  
µm - micrômetros  
µL - microlitros  
ng - nanogramas  
nm - nanômetros  
% - por cento

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 OBJETIVOS .....	03
1.1.1 OBJETIVO GERAL.....	03
1.1. 2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	03
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	04
2.1 INCIDÊNCIA.....	04
2.2 MUTAÇÕES BRAF EM MELANOMAS CUTÂNEOS.....	05
2.3 MUTAÇÕES C-KIT EM MELANOMAS CUTÂNEOS.....	14
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	18
3.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	18
3.1.1 Critérios de Inclusão.....	18
3.1.2 Critérios de Exclusão.....	18
3.2 COLETA DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS .....	18
3.2.1 Variáveis Clínicas .....	19
3.2.2 Variáveis Anatomopatológicas .....	19
3.3 ANÁLISE GENÉTICA MOLECULAR.....	21
3.3.1 Isolamento do DNA .....	21
3.3.2 Detecção de mutações BRAF .....	21
3.3.3 Detecção da mutação c-Kit .....	25
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	25
<b>4 RESULTADOS</b> .....	27
4.1 AVALIAÇÃO GERAL DAS AMOSTRAS DE MELANOMAS CUTÂNEOS .....	27
4.1.1 Grupo I – Melanomas Finos .....	27
4.1.2 Grupo II – Melanomas Grossos.....	30
4.2 AVALIAÇÃO DOS DADOS DE PCR DOS MELANOMAS CUTÂNEOS.....	33
4.2.1 Mutações BRAF .....	33
4.2.1.1 Comparação entre os melanomas com e sem mutações BRAF .....	36
4.2.1.2 Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier .....	40
4.2.2 Mutações c-Kit.....	43
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	45
5.1 FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES BRAF .....	45
5.2 CORRELAÇÃO DAS MUTAÇÕES BRAF COM FASE DE CRESCIMENTO E ESPESSURA TUMORAL.....	47
5.3 MUTAÇÕES BRAF EM PARES DE TUMORES PRIMÁRIOS E METÁSTASES CORRESPONDENTES.....	49
5.4 CORRELAÇÃO DAS MUTAÇÕES BRAF COM PARÂMETROS CLÍNICOS.....	51
5.5 CORRELAÇÃO DAS MUTAÇÕES BRAF COM PARÂMETROS HISTOLÓGICOS.....	54
5.6 CORRELAÇÃO DAS MUTAÇÕES BRAF COM SOBREVIDA CLÍNICA.....	55
5.7 CORRELAÇÃO DAS MUTAÇÕES BRAF COM A PRESENÇA DE NEVO ASSOCIADO .....	55
5.8 MUTAÇÕES C-KIT.....	56
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	58
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
<b>APÊNDICES</b> .....	64
<b>ANEXO</b> .....	80

## 1 INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo, neoplasia originada da transformação maligna de melanócitos localizados na camada basal da epiderme, é uma das neoplasias mais agressivas e sua incidência é crescente, principalmente entre a população branca e, até o presente momento, não há cura efetiva para os pacientes com melanoma disseminado (WEINLICH, 2003; HOMSI, 2005).

Dentre os fatores preditivos de sobrevida em melanomas cutâneos primários os mais importantes são a espessura da lesão (índice de Breslow), a presença de ulceração e o envolvimento de linfonodos. Idade, sexo, localização anatômica e lesões satélites também são importantes e há ainda fatores sendo investigados, como índice mitótico, presença de regressão e infiltrado inflamatório tumoral (HOMSI, 2005).

Dados clínicos e histológicos de melanomas cutâneos primários fornecem informações prognósticas úteis, porém o curso clínico individual de uma lesão é imprevisível e há necessidade de fatores adicionais para predizer sua evolução (RICANIADIS, 2001).

Recentemente, técnicas de biologia molecular têm possibilitado a identificação de marcadores moleculares que podem ter valor prognóstico em melanomas (HOMSI, 2005). Inúmeras pesquisas tentam estabelecer correlações entre a expressão de determinado marcador com o risco de progressão da neoplasia, presença de doença metastática e sobrevida dos pacientes (RICANIADIS, 2001; WEINLICH, 2003). Entre os marcadores moleculares envolvidos na patogênese do melanoma há os reguladores de ciclo celular, como o gene BRAF e o proto-oncogene c-Kit (FIGUEIREDO, 2003).

Mutações do gene BRAF, localizado no cromossomo 7q, são as mais frequentes mutações (60-80%) encontradas em melanomas humanos (DAVIES, 2002; HOMSI, 2005). Oitenta por cento dessas mutações são encontradas no éxon 15, em um único resíduo de aminoácido, usualmente uma substituição de valina por ácido glutâmico (V599E, agora referido como V600E). O gene BRAF codifica uma cascata serina/treonina quinase na via RAS/RAF/MAPK, que está envolvida na

transdução de sinais mitogênicos dos receptores de membrana ao núcleo das células (DAVIES, 2002). A frequência de mutações BRAF excede significativamente a frequência de outras mutações conhecidas em melanomas cutâneos como N-Ras, p16 e p 53 (SHINOZAKI, 2004). Essas outras mutações são encontradas em um número significativo de nevos melanocíticos, sugerindo que elas representam um passo inicial no desenvolvimento de neoplasias melanocíticas. Não é claro, entretanto, se essas mutações estão associadas com a progressão de melanomas (DONG, 2003). A frequente ocorrência de mutação BRAF em melanomas sugere que inibidores específicos do gene BRAF podem ser utilizados para o tratamento de melanomas avançados (MALDONADO, 2003).

O receptor c-Kit tem um papel importante na fisiologia dos melanócitos, influenciando a melanogênese, proliferação, migração e sobrevivência dessas células (ALEXEEV, 2006). Em melanomas, apenas a mutação no éxon 11 (L576P) foi reportada e aparentemente ela não é encontrada em mais que 2% dos melanomas. O estudo desta mutação em melanomas cutâneos pode auxiliar a identificar pacientes que possam se beneficiar do uso do imatinib, um inibidor do c-Kit que vem sendo utilizado com sucesso no tratamento de pacientes com GISTs - tumores estromais gastrointestinais (WILLMORE-PAYNE, 2005).

A combinação de achados clínicos e histológicos com dados de PCR pode facilitar a caracterização de marcadores biológicos e de novas proteínas envolvidas na patogênese, desenvolvimento e progressão dos melanomas, com possíveis implicações para o prognóstico e tratamento desta neoplasia.

Além disso, há pouca informação na literatura atual sobre mutações BRAF, c-Kit ou outros marcadores de progressão do melanoma cutâneo em pacientes sul-americanos utilizando-se técnicas de biologia molecular (URIBE, 2003; NETO, 2007). Dos poucos estudos disponíveis nesta população, nenhum tentou correlacionar todos os parâmetros clínicos e histológicos relacionados a esta neoplasia, nem sobrevida dos pacientes.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi identificar a incidência de mutações do gene BRAF e c-Kit em espécimens cirúrgicos de melanomas cutâneos primários e metastáticos através da técnica Real-Time Polimerase Chain Reaction (TaqMan Real-Time PCR) e avaliar sua correlação com fatores prognósticos clínicos e anatomopatológicos atualmente conhecidos, a fim de caracterizar sua relação com a progressão tumoral e seus efeitos na evolução da doença.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Através da identificação de mutações do gene BRAF e c-Kit em uma população de portadores de melanomas cutâneos, procuramos estabelecer:

1. Incidência dessas mutações nos melanomas primários e metastáticos;
2. Tipo específico de mutação existente;
3. Incidência dessas mutações em pele normal;
4. Incidência dessas mutações em melanomas finos ( $\leq 1\text{mm}$ ) e grossos ( $> 1\text{mm}$ ).
5. Correlação da presença dessas mutações com a progressão tumoral;
6. Correlação entre presença dessas mutações com fatores prognósticos clínicos ( sexo, idade, localização da lesão e sobrevida );
7. Correlação entre presença de mutações com fatores prognósticos histológicos (índice de Breslow, nível de Clark, número de mitoses, presença de ulceração, regressão ou satelitose).



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 INCIDÊNCIA

Segundo as Estimativas de Incidência de Câncer no Brasil, para 2010, foram previstos 2.960 casos novos de melanomas cutâneos em homens e 2.970 casos novos em mulheres. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul, e o estado do Paraná apresenta a terceira maior incidência: 5,63 casos para cada 100 mil homens e 4,97 casos para cada 100 mil mulheres, atrás somente de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. O melanoma de pele é menos frequente do que os outros tumores de pele (carcinomas basocelulares e carcinomas de células escamosas), porém sua letalidade é mais elevada devido ao risco de metástases. Melanomas causam mais que 75% das mortes por câncer de pele, e o prognóstico desse tipo de neoplasia pode ser considerado bom, se detectado nos estádios iniciais. Nos últimos anos houve uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do mesmo. Nos países desenvolvidos a sobrevida média estimada em cinco anos é de 73%, enquanto que, para os países em desenvolvimento a sobrevida média é de 56%. A média mundial estimada é de 69% (INCA, 2010).

A AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS) estima que a incidência do melanoma cutâneo cresça 4,1% ao ano, mais rápido do que qualquer outra neoplasia entre a população branca. Ela estima que 68.720 novos casos de melanoma e 8.650 mortes por melanoma ocorram nos EUA em 2009 (ACS, 2009).

## 2.2 MUTAÇÕES BRAF EM MELANOMAS CUTÂNEOS

O desenvolvimento do melanoma cutâneo é um clássico exemplo de uma neoplasia que progride passando por diferentes estágios reconhecidos através de suas características clínicas e histológicas. Entretanto, o evento molecular chave que desencadeia a progressão desta neoplasia ainda não foi esclarecido, o que explica porque não há terapia específica para seu tratamento e porque quase nenhum benefício clínico de novas terapias foi claramente demonstrado em pacientes com melanoma desde a década de 70 (WINNENPENNINCKX, 2006).

Estudos realizados em lesões melanocíticas enumeraram diversos genes relacionados com o desenvolvimento e progressão do melanoma e, atualmente, a mutação do gene BRAF representa o principal biomarcador deste tumor (CHIN, 2008).

A mutação do gene BRAF é a mais frequente mutação (60-80%) observada em melanomas humanos. Oitenta por cento dessas mutações são encontradas no éxon 15, em um único resíduo de aminoácido, identificadas como transversões T1796A, que modificam o códon “wild-type” GTG (valina) para GAG (ácido glutâmico) na posição 599 - V599E (DAVIES, 2002).

O gene BRAF codifica uma cascata serina/treonina quinase que atua na via RAS/RAF/MAPK, essencial para a regulação do ciclo celular. Em melanomas, a ativação da cascata RAS/RAF/MAPK pode ocorrer através de mutações nos genes RAS e RAF. RAF é uma serina/treonina quinase que quando ativada fosforila MEK que por sua vez fosforila ERK. ERK quando ativada fosforila diferentes alvos citoplasmáticos e nucleares, mediando uma resposta celular. Essa cascata é um sistema sinalizador membrana-núcleo que controla a proliferação e diferenciação celular, bem como apoptose em células de mamíferos. Nos humanos, são conhecidas três proteínas RAF: A-RAF, B-RAF e C-RAF (também conhecida como RAF-1). A proteína B-RAF é expressa em tecidos neurais e no testículo, e, das três proteínas é a que apresenta a maior atividade basal. Os resíduos treonina 598 e serina 601 da proteína B-RAF constituem os dois sítios de fosforilação requeridos para sua ativação, induzida pela proteína RAS e quando eles são trocados por

resíduos ácidos, B-RAF torna-se ativa. As mutações BRAF aumentam significativamente a atividade quinase, o que induz proliferação celular contínua, que favorece o crescimento neoplásico. (DONG, 2003; OMHOLT, 2003).

A frequência de mutações do gene BRAF supera significativamente a frequência de outras mutações importantes em melanomas, como o N-Ras, p16 e p53 (SHINOZAKI, 2004). A prevalência de mutações do gene BRAF em melanomas cutâneos, indica que a ativação da cascata MAPK representa um rito de passagem obrigatório na transformação dos melanócitos e tal dependência pode representar um ponto de ataque para o tratamento desta neoplasia (CHIN, 2008).

Mutações do gene BRAF têm sido reportadas com alta frequência em melanomas, enquanto em outros tumores, a frequência desta mutação é menor. No estudo de Davies et al. mutações neste gene foram encontradas em 20 de 34 (59%) linhagens de células tumorais, 12 de 15 (80%) culturas celulares denominadas "short-terms cultures" e em seis de nove (67%) amostras teciduais de melanomas. A transversoão T1796A no éxon 15, que resulta na mutação V599, representou mais de 90% das mutações detectadas nas amostras de melanoma. Essa mutação V599E afeta o domínio BRAF quinase e aumenta sua atividade, o que induz proliferação contínua, responsável pelo crescimento neoplásico. Um número limitado de mutações foram observadas também no éxon 11(DAVIES, 2002).

Tais mutações são identificadas em um número significativo de lesões melanocíticas, incluindo nevos, sugerindo que estas representam o passo inicial no desenvolvimento das neoplasias melanocíticas. Porém não é claro se as mutações BRAF estão associadas com a progressão do melanoma. Através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para "screening" do éxon 15 do gene BRAF, Dong et al. identificaram a mutação com a mesma alta frequência (62-72%) em nevos melanocíticos, melanomas em fase vertical de crescimento (melanomas com a presença de componente dérmico invasivo), melanomas metastáticos e células de linhagem de melanoma. Em apenas 10% dos casos em fase radial de crescimento (tumores confinados à epiderme ou à derme superficial) a mutação foi identificada. A disparidade na frequência da mutação do gene BRAF em nevos (71%), melanomas em fase vertical de crescimento (63%) e melanoma metastático (62%) em relação aos melanomas em fase de crescimento radial (10%) foi significativa. Devido a

esses achados, os autores sugeriram que a mutação BRAF pode não estar associada com a iniciação da grande maioria dos melanomas, mas pode refletir a progressão desses tumores de uma fase radial de crescimento para fase vertical de crescimento ou melanoma metastático, com implicações prognósticas importantes e pode, portanto, representar um biomarcador de progressão desta neoplasia (DONG, 2003).

Omholt et al., através de PCR para análise de mutações nos éxons 15 e 11, avaliaram 71 melanomas cutâneos primários e suas metástases correspondentes (n=88) o que tornou possível a determinação do estágio em que a mutação ocorreu durante a evolução da neoplasia. A mutação do gene BRAF foi encontrada em 42(59%) de 71 pacientes. Em todas as lesões primárias onde a mutação foi encontrada, houve também a detecção da mutação na lesão metastática correspondente, o que sugere que a mutação BRAF representa um evento inicial no desenvolvimento da neoplasia e não está associada com a iniciação de uma lesão metastática. Com o uso de técnicas de microdissecção tecidual a laser, foi demonstrado que a mutação BRAF estava presente nas células em fase de crescimento radial da neoplasia e preservadas na sua fase de crescimento vertical. A presença da mutação na fase radial de crescimento confirma que a mutação ocorre inicialmente e que não é responsável pela transição de uma fase de crescimento radial para uma fase de crescimento vertical. Neste estudo, não houve correlação da presença da mutação com nenhum parâmetro clínico, incluindo sexo, idade e estadiamento clínico ou com tipo histológico do tumor, nível de Clark, espessura tumoral, ulceração e local da primeira recorrência. E também não houve nenhuma relação da mutação com a sobrevida geral dos pacientes. Os autores afirmam que apesar da mutação do gene BRAF não parecer ter importância na iniciação de metástases, o fato de que ela está presente através da progressão tumoral, indica que ela possa influenciar a manutenção da neoplasia. (OMHOLT, 2003).

Em uma coorte de 115 pacientes com melanomas cutâneos primários foi observado que a mutação BRAF foi mais comum em melanomas que ocorreram em pele com exposição solar intermitente (tronco): 23 de 43 pacientes (54%). A mutação foi rara em melanomas de pele com exposição solar crônica, como face e extremidades (um de 12 pacientes), e em pele não exposta ao sol, como palmas,

plantas, região subungueal (seis de 39 pacientes) e mucosas (dois de 21 pacientes). Todas as mutações ocorreram na posição V599 e não houve associação com o prognóstico desses pacientes. De acordo com este estudo, esses achados demonstram que as mutações BRAF são mais frequentes em melanomas cujos dados epidemiológicos indicam um papel patogênico da exposição solar intermitente em oposição à exposição solar crônica. Essas lesões ocorrem predominantemente no tronco, são melanomas do tipo disseminação superficial ou nodulares e ocorrem em indivíduos mais jovens do que melanomas em outros locais. Porém, a relação da mutação do gene BRAF com exposição solar é complexa, pois essas mutações não apresentaram a assinatura padrão UVB. Os autores sugerem que há um mecanismo genético na indução do melanoma e que a exposição intermitente ao sol pode ter um papel patogênico (MALDONADO, 2003).

Com o objetivo de detectar a incidência de mutações do gene BRAF nos éxons 11 e 15 em melanomas cutâneos e sua relação com progressão tumoral e prognóstico dos pacientes, Shinozaki et al., através da técnica de PCR, avaliaram 59 melanomas cutâneos primários e 68 melanomas metastáticos. Dezoito pacientes (31%) com tumores primários apresentaram mutações no éxon 15 e nenhuma mutação foi detectada no éxon 11. Não houve correlação do índice de Breslow com a incidência de mutações BRAF e, a presença destas, não alterou a sobrevida livre de doença desses pacientes. Em 39 (57%) dos tumores metastáticos foram detectadas mutações que foram significativamente maiores do que nos melanomas primários. Mutações BRAF podem, portanto, ser adquiridas durante o desenvolvimento de metástase, mas não são um fator significativo no desenvolvimento do tumor primário e no prognóstico da doença (SHINOZAKI, 2004).

Em outro estudo, 37 casos de melanomas primários de espessura variável também foram examinados por PCR, a fim de detectar mutações BRAF no éxon 15, que foram encontradas em 17 casos (46%). A mutação ocorreu em melanomas finos e grossos, o que sugere que ela pode ocorrer em estádios iniciais da progressão do melanoma. Os achados deste estudo também indicaram que mutações ao acaso (“tandem mutations”) representam um percentual substancial (29%) de mutações no éxon 15 do gene BRAF. Essas mutações compreenderam substituições 1795-96GT → AG, resultando em V599R; 1795GT → A, resultando em V599K; 1796-97GT → AA, resultando em V599E e 1779T → A, resultando em D593E. Nenhuma mutação “tandem” foi encontrada em amostras de pele normal dos pacientes deste estudo e

todas ocorreram em melanomas com índice de Breslow entre 0,38 e 0,40 mm, o que mostra que elas ocorrem em fases iniciais de progressão do melanoma (THOMAS, 2004).

Goydos et al. avaliaram 115 espécimes de melanomas com o objetivo de detectar a incidência de mutações nos componentes da cascatata MAPK. A mutação V599E foi encontrada em 68 amostras (59%), ou seja, 25 de 36 melanomas primários, 18 de 27 metástases regionais, 16 de 40 metástases nodais e em nove de 12 metástases à distância. Quando múltiplas amostras do mesmo paciente foram examinadas, representando diferentes estágios da progressão do tumor, observou-se uma diferença significativa na incidência da mutação V599E. Os tumores primários, as metástases regionais e as metástases à distância apresentaram maior incidência da mutação do que metástases nodais. Foi observado que, frequentemente, no mesmo paciente, a metástase nodal não apresentava mesma mutação presente no tumor primário, na metástase regional ou na metástase à distância. Os autores interpretaram esse achado considerando o tumor primário como um mosaico contendo células com e sem mutação (“wild-type”). Mutações na cascata MAPK podem não ser necessárias para que o melanoma metastatise para cadeias nodais regionais e ambas as células do tumor primário, “wild-type” e mutadas, podem constituir metástases regionais. Isso poderia explicar o achado frequente da mutação V599E no tumor primário mas não na metástase nodal do mesmo paciente (GOYDOS, 2005).

Dezenove (38%) de 50 melanomas cutâneos primários, também analisados através de PCR, apresentaram mutações BRAF no éxon 15, e o sequenciamento desses casos positivos, revelou 63% de mutações V599E e 26% V599K. A detecção destas mutações não apresentou associação estatística com o risco de metástases subsequentes no seguimento destes pacientes, porém a ativação deste oncogene contribuiu para o desenvolvimento do melanoma (DEICHMANN, 2004).

Vinte e quatro (40%) de 60 amostras de metástases cutâneas e subcutâneas correspondentes aos melanomas primários acima citados apresentaram mutações BRAF. Esta frequência não excedeu a que foi relatada nos melanomas primários e a presença da mutação não foi associada com maior risco de metástases subsequentes. Uma redução no espectro dessas proteínas foi observado durante a transição de melanomas primários para metástases cutâneas/subcutâneas. Ao todo,

nove mutações diferentes em proteínas do gene BRAF foram detectadas nos 60 espécimens, ao contrário de 22 nas amostras de melanomas primários. Esse estudo observou que o nível de Clark, exposição à radiação UV, e tipo da metástase subsequente (ausente, nodal, visceral) não foram fatores significativos associados à ocorrência da mutação (DEICHMANN, 2005).

Mutações BRAF V599E e V599K foram detectadas em 24 (44%) de 54 amostras de metástases linfonodais de melanoma pertencentes à mesma série dos dois estudos acima citados. Houve associação significativa entre a presença de mutações e o desenvolvimento de metástases viscerais subsequentes. A conclusão deste estudo é de que durante a transição de lesões primárias para metástases linfonodais, o espectro das mutações BRAF diminui, essas mutações são um evento inicial na transformação melanocítica e persistem através do desenvolvimento de metástases, o que representa implicações prognósticas importantes para os pacientes (KIRSCHNER, 2005).

Mutações no éxon 15 do gene BRAF foram encontradas em 13 de 52 (25%) melanomas cutâneos primários em estudo realizado por Lang *et al.* Nestes 52 casos a mutação foi encontrada em cinco de 17 (29%) melanomas classificados como disseminação superficial, três de 11 (27%) melanomas nodulares, dois de 13 (15%) melanomas acrais-lentiginosos, em um caso de melanoma em mucosa (100%) e em dois de 10 (20%) lentigo maligna melanomas. Seis de 32 (19%) melanomas primários localizados em áreas constantemente expostas ao sol (cabeça, pescoço e mãos) e sete de 20 (35%) lesões provenientes de áreas habitualmente cobertas (troco, braços e pernas) apresentaram a mutação V599E, mas não houve diferença estatística significativa entre eles. Houve uma incidência maior de mutação em melanomas do tipo disseminação superficial e em melanomas nodulares, bem como uma associação maior da mesma com lesões localizadas em áreas com exposição solar intermitente. De acordo com este estudo, a presença da mutação em nevos melanocíticos, indica que ela pode ocorrer em lesões melanocíticas benignas e eventos adicionais são necessários para o desenvolvimento do melanoma. A ausência de mutações em determinada proporção de melanomas primários e metastáticos sugere que há vias genéticas alternativas na etiopatogenia desta neoplasia (LANG, 2005).

De acordo com Libra et al. mutações do gene BRAF ocorrem antes do desenvolvimento de doença metastática. A presença de mutações V600E e G469S foi detectada em 15 de 23 pacientes (61%) com melanoma cutâneo primário e em sete de 12 pacientes (58%) com melanoma metastático. Essa frequência semelhante indica que mutações ocorreram já nos estágios iniciais do desenvolvimento da neoplasia. Nenhuma correlação das mutações com sexo, idade e localização da lesão primária, nem com o índice de Breslow, nível de Clark, presença de regressão e ulceração foi observada (LIBRA, 2005).

Com o objetivo de melhor caracterizar a frequência da mutação do gene BRAF em melanoma cutâneos, Saldanha et al. avaliaram 59 espécimens divididos em quatro grupos: disseminação superficial, nodular, lentigo maligna e acral lentiginoso. A frequência da mutação no éxon 15 foi de 37,3% (22 casos). Houve uma diferença significativa na presença da mutação BRAF entre os subtipos de melanomas: dois de 21 (9,5%) melanomas acrais- lentiginosos apresentaram a mutação contra nove de 14 (64%) do tipo disseminação superficial, quatro de 11 (36,4%) nodulares e sete de 13 (53,4%) lentigo maligna. Não houve correlação da mutação com outras variáveis clínicas como idade, sexo, índice de Breslow ou nível de Clark. Mutações NRAS no éxon 2 também foram analisadas e 40 de 59 casos (67,8%) apresentaram uma ou outra mutação o que mostra que a ativação da cascata RAS/RAF/MAPK é importante em todos os subtipos de melanoma, mas o mecanismo através do qual ela é ativada pode variar (SALDANHA, 2006).

O estudo acima contrasta com estudo prévio, onde a mutação do gene BRAF foi pesquisada em 35 melanomas primários provenientes da população japonesa. Sasaki et al. identificaram a mutação em nove (26%) casos. Destes, em 4 de 8 (50%) subtipo disseminação superficial, 5 de 15 (33%) subtipo acral lentiginoso, em nenhum dos 6 melanomas nodulares e dos 5 lentigo maligna e um melanoma de mucosa, com diferença estatística significativa entre os subtipos disseminação superficial e acral lentiginoso. A mutação BRAF foi observada frequentemente, em lesões pequenas e antes do desenvolvimento de metástases, indicando que a ativação deste gene possa ser um dos eventos iniciais na patogênese de alguns melanomas (SASAKI, 2004).

A discrepância entre esses dois estudos, pode ser explicada devido a diferenças na patogênese dos melanomas na população do Japão e Reino Unido e



também, pelo fato de que a frequência das mutações são dependentes do método de detecção (SALDANHA, 2006).

Mutações no gene BRAF foram detectadas em estudo que utilizou sequenciamento de DNA capturado através de microdissecção a laser em 18 melanomas in situ, 64 melanomas primários invasivos e 51 nevos. Os nevos mostraram a maior frequência de mutações BRAF (82%). Em melanomas invasivos, mutações foram identificadas em 29% dos casos e em apenas 5,6% dos melanomas in situ. A maioria das mutações foi encontrada em melanomas primários do subtipo disseminação superficial, bem como em lesões de áreas com exposição solar intermitente. Mutações também ocorreram com maior frequência em tumores associados a um nevo contíguo, apesar deste não ter sido observado em todos melanomas mutados. Esses dados apóiam a evidência de que a cascata RAS/RAF/MAPK está ativada em uma grande proporção de lesões melanocíticas, mas essas mutações não são suficientes para a transformação maligna. Os autores sugerem que mutações no gene BRAF contribuem para o desenvolvimento de lesões melanocíticas benignas mas, no caso de melanomas, contribuem apenas em conjunto com outras mutações (POYNTER, 2006).

Goel et al. analisaram 69 amostras de melanomas primários e encontraram a mutação V599E em 33 (57%) casos. A presença da mutação apresentou associação significativa com espessura tumoral em todos subtipos de melanoma e foi mais frequente em pacientes jovens. A mutação NRAS no éxon 2 também foi avaliada e observou-se que mutações concomitantes BRAF e NRAS são raras o que sugere que a ativação em apenas um ponto na cascata MAPK quinase é requerida para ativar seus alvos celulares e iniciar a proliferação celular e/ou tumorigênese (GOEL, 2006).

Para estabelecer se uma doença é composta de subtipos distintos é necessário integrar características histopatológicas com fatores biológicos e identificar grupos de doenças homogêneos em sua etiologia, comportamento clínico e terapêutica. Esses subtipos, se encontrados, podem formar a base de uma classificação clínica verdadeiramente útil. Viros et al., utilizaram uma coorte de 302 amostras de melanomas cutâneos primários, com o objetivo de melhorar a classificação dos melanomas. Eles tentaram estabelecer uma correlação entre

características histomorfológicas e alterações genéticas, representadas pela mutação dos genes BRAF e NRAS, os oncogenes mais comumente mutados em melanomas. De acordo com os autores, melanomas com a mutação BRAF apresentaram características morfológicas distintas como maior número de melanócitos distribuídos nas camadas superficiais da epiderme, maior formação de ninhos na epiderme, aumento da espessura da epiderme envolvida pelo tumor e melhor demarcação da lesão em relação a epiderme adjacente, bem como células tumorais maiores, mais arredondadas e com maior quantidade de pigmento. Estes achados sugerem que pesquisas futuras revelarão associação de alterações fenotípicas adicionais com outros fatores genéticos. Os autores identificaram forte associação entre o aumento no número de melanócitos isolados distribuídos na epiderme e formação de ninhos com a mutação BRAF, mas concluíram que esses melanócitos provavelmente não estão associados diretamente com a mutação, porque eles não são comumente encontrados em nevos, muitos dos quais apresentam mutações BRAF, sugerindo que outros genes, em conjunto com BRAF, podem estar envolvidos. Em contraste, muitos nevos apresentam melanócitos arranjados em ninhos e são bem circunscritos, características também mais frequentes em melanomas com mutações BRAF. Melanomas com a mutação NRAS não puderam ser distintos baseados nessas características morfológicas. Usando simples combinações de características morfológicas, a mutação BRAF pôde ser prevista com 90,8% de acurácia na coorte inteira. Uma melhor classificação dos melanomas que combine a análise de fatores genéticos conhecidos com características histomorfológicas pode dividir os melanomas em subgrupos que diferem entre si em termos de evolução clínica e respostas a terapias genéticas quando elas se tornarem disponíveis (VIROS, 2008).

A descoberta de mutações BRAF em melanomas imediatamente propiciou o desenvolvimento de pesquisas em busca de terapias efetivas para essa doença, sendo o próprio gene BRAF o alvo inicial, já que a maioria das mutações envolve um único resíduo aminoácido da proteína. A identificação da alta taxa de mutações sinaliza também que outras moléculas da cascata RAS/RAF/MAPK podem servir como alvo terapêutico, pois diversos receptores tirosina - quinase bem como RAS estão mutados em alguns casos de melanomas. Agentes específicos para o gene BRAF, como o sorafenib estão sendo atualmente investigados (HALUSKA, 2007).

### 2.3 MUTAÇÕES C-KIT EM MELANOMAS CUTÂNEOS

A proteína c-Kit (CD 117) é uma tirosina quinase transmembrana que atua como receptor para o fator de crescimento de mastócitos (também chamado “stem cell factor” ou “Kit ligant”). Quinases são membros de uma grande família de proteínas que desempenham papéis importantes no processo de sinalização e controle do crescimento celular. Diversos tipos de neoplasias contêm mutações específicas em genes que codificam proteínas quinases e são provavelmente responsáveis por eventos oncogênicos primários. Essas mutações resultam na produção de uma proteína quinase ativada que não é mais sensível aos sinais inibitórios habituais e, a sinalização constante de tais proteínas estimula a proliferação celular, ativa cascatas anti-apoptóticas e a oncogênese. (WILLMORE-PAYNE, 2005).

O receptor c-Kit sinaliza apenas em resposta ao seu ligante, o “stem cell factor”. Mutações no gene que codifica o c-Kit fazem com que seu ligante específico não seja mais necessário, o que resulta em proteínas constitutivamente ativas e o c-Kit passa a sinalizar independentemente do seu ligante. A proteína c-Kit é comumente ativada por mutações em tumores estromais gastro intestinais (GISTs) e a maioria das mutações estão presentes no éxon 11 do gene c-Kit. A expressão de c-Kit em neoplasias malignas é de grande interesse porque ela é um dos alvos do inibidor de tirosina quinase, o imatinib mesilato (STI571, Glivec). Em melanomas, a mutação mais frequentemente descrita é a L576P no éxon 11, mas ela está presente em talvez não mais que 2% dos melanomas (WENT, 2004; WILLMORE-PAYNE, 2005).

Um estudo realizado com o objetivo de investigar se o c-Kit regula a proliferação normal de melanócitos em humanos e se ele desempenha alguma função em melanomas, mostrou que melanócitos humanos normais respondem ao fator de crescimento de mastócitos (MGF), o ligante do Kit, que estimula a fosforilação de resíduos de tirosina do próprio Kit e induz a fosforilação sequencial de resíduos de tirosina em diversas outras proteínas e identificou a MAPK como uma das proteínas intermediárias fosforiladas nesta cascata. Foi observado que o MGF não induziu nem a proliferação nem a cascata de fosforilação de proteínas ou

a ativação da MAPK na maioria das culturas de células de melanomas nodulares primários e metastáticos que cresceram *in vitro*, independente de fatores exógenos, o que mostra que c-Kit não é responsável pela proliferação autônoma da maioria dos melanomas. Os autores concluíram que embora a c-Kit quinase seja um potente regulador de melanócitos humanos normais, sua atividade não está associada com transformação maligna (FUNASAKA, 1992).

Went et al. estudaram a prevalência da expressão imunoistoquímica do c-kit em diversos tipos de neoplasias e, dos 39 melanomas analisados, 14 (35%) foram c-Kit positivos. Dois melanomas positivos foram posteriormente avaliados por PCR e melanoma foi a única neoplasia, além dos GISTs que apresentou a mutação L576P neste estudo. Os autores acreditam entretanto, que o achado da mutação no éxon 11 em um desses dois melanomas parece superestimar a verdadeira prevalência da mesma. Esses resultados sugerem que a expressão de kit é infrequente na maioria das neoplasias e que com exceção dos GISTs, mutações Kit são raras em tumores que apresentam positividade imunoistoquímica (WENT, 2004).

Willmore-Payne et al. pesquisaram em 100 casos de melanomas (74 metastáticos, 12 primários e quatro *in situ*) a presença de mutações c-Kit. Previamente, todos os casos foram submetidos a exame imunoistoquímico e apenas os casos com alguma positividade para CD117 foram avaliados através de PCR e sequenciamento para identificação de mutações ativas no gene. Foi observado que a maioria dos melanomas invasivos e metastáticos não apresentaram expressão imunoistoquímica do c-Kit, embora todas as lesões *in situ* e o componente juncional das lesões invasivas foram fortemente positivos, sugerindo que a maioria dos melanomas perdem a expressão do c-Kit durante a progressão tumoral. Dois casos de melanomas metastático (2%) com positividade imunoistoquímica forte e difusa apresentaram uma mutação ativa do c-Kit, a L576P, resultado de uma troca de pares de bases T → C no éxon 11. Nenhum alelo normal esteve presente nestes casos, sugerindo que essa mutação foi ou homozigota ou hemizigota e o isolamento do DNA de tecido normal destes dois casos não apresentou alteração. Nenhuma outra mutação do c-kit verificada nos éxons 9, 13 e 17 foi observada e esses dois casos positivos não apresentaram mutações BRAF, também pesquisada nesse estudo. Estes dois casos corresponderam a lesões metastáticas cujas lesões primárias correspondentes não foram avaliadas (WILLMORE-PAYNE, 2005).

Em estudo subsequente, o mesmo grupo de pesquisadores acima, avaliou 53 casos adicionais de melanomas e encontrou mais um caso com a mutação L576P. Avaliação do sequenciamento do DNA desses três casos mostrou predominância do alelo mutante, o que indica perda seletiva do alelo normal. Para determinar o número de cópias do c-Kit, hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) foi realizada. Um caso mostrou amplificação do gene e os outros dois casos se apresentaram em estado diplóide, mas não amplificados, o que sugere que eles sejam homozigotos para o gene mutante. Devido aos resultados obtidos nesta análise, os autores sugeriram que em melanomas, a mutação L576P é oncogênica apenas quando o seu produto proteico está em abundância em relação ao normal (WILLMORE-PAYNE, 2006).

Melanócitos murinos geneticamente alterados para expressarem endogenamente um receptor de c-Kit (D814Y) foram utilizados em um estudo cujo objetivo era caracterizar respostas fisiológicas de melanócitos à ativação do receptor do c-Kit e determinar se tal ativação induzia a proliferação não controlada de melanócitos, promovendo a tumorigênese, a melanogênese ou a migração dessas células produtoras de pigmento. A hipótese era que a ativação do receptor seria capaz de desencadear proliferação descontrolada de melanócitos ou estimular a biosíntese de melanina, mas ao contrário, foi demonstrado que a sinalização do receptor c-Kit não estimulou a melanogênese nem a proliferação, porém estimulou de maneira significativa a migração de melanócitos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Também foi observado que tal sinalização não esteve associada com a transformação maligna de melanócitos. Esses resultados, de acordo com os autores, sugerem que em melanócitos de mamíferos, a ativação do receptor do c-Kit é primariamente responsável pela transmissão de sinais pró-migratórios que antagonizam a proliferação e a melanogênese e isso explicaria porque melanócitos malignos perdem a expressão do c-Kit durante a progressão do melanoma. Há, portanto, evidências de que a ativação do receptor c-Kit é responsável pela estimulação da migração e não pela proliferação melanocítica, já que seus estudos *in vivo* claramente demonstraram que melanócitos mutantes, geneticamente alterados adquiriram maior habilidade para migração (ALEXEEV, 2006).

Resultados do estudo de Curtin et al. demonstraram que aberrações genéticas que afetam o c-Kit ocorrem frequentemente em melanomas de mucosa,

acrais e naqueles em pele com dano solar. A análise sequencial dos sítios comuns de mutações do c-kit, os éxons 11, 13, 17 e 18 em 102 tumores encontrou mutações e/ou aumento do número de cópias em 15 (39%) de 38 melanomas de mucosa, 10 (36%) de 28 melanomas acrais, cinco (28%) de 18 melanomas em pele sujeita a dano solar e em nenhum (0%) de 18 melanomas em pele sem dano solar. Os autores procuraram comparar a presença de alterações genéticas do c-Kit com alguns fatores histológicos como o padrão de crescimento do tumor primário e dano solar, caracterizado pela presença ou ausência de elastose solar acentuada, e observaram que os melanomas com padrão de crescimento lentiginoso, caracterizados por melanócitos isolados alinhados ao longo da camada basal da epiderme, apresentaram maior frequência dessas alterações. Contrariamente, tumores em pele sem dano solar, sem mutações ou aumento do número de cópias do c-Kit, apresentaram padrão de crescimento pagetóide, com melanócitos espalhados dentro da epiderme. De acordo com os autores, este estudo identifica o c-Kit como um oncogene em melanoma e como um potencial alvo terapêutico (CURTIN, 2006).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (PP 1422- Anexo 1).

#### 3.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

##### 3.1.1 Critérios de Inclusão

A amostra estudada foi composta por 96 espécimes cirúrgicos de lesões primárias de pacientes de ambos os sexos, de todas as faixas etárias, portadores de melanoma cutâneo, operados entre 2000 até 2004 no “Hospital Erasto Gaertner”, Curitiba, Paraná. Metástases linfonodais correspondentes a estas lesões também foram incluídas para avaliação em 15 casos.

##### 3.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes submetidos somente à biópsia incisional; pacientes em cujos prontuários não foram encontradas informações relevantes para o estudo; blocos de parafina com amostras insuficientes ou em mal estado de conservação e casos de melanoma *in situ*.

#### 3.2 COLETA DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS

Neste trabalho foram avaliadas quatro variáveis clínicas e seis anatomopatológicas.

### 3.2.1 Variáveis Clínicas

Através da revisão dos prontuários do Hospital Erasto Gaertner foram tabulados os seguintes dados clínicos:

1. sexo;
2. idade;
3. localização da lesão;
4. evolução clínica.

De acordo com a localização da lesão, os melanomas foram divididos em dois grupos:

- 1- Aqueles localizados em pele sujeita à exposição solar intermitente ou pele raramente exposta, que incluiu tronco, membros superiores, membros inferiores e região acral;
- 2- Aqueles localizados em pele sujeita à exposição solar crônica, ou seja, cabeça e pescoço (MALDONADO, 2003).

A evolução clínica foi avaliada utilizando o mesmo método de estudo que investigou fatores prognósticos em melanomas e os pacientes foram divididos em dois grupos:

- 1- Evolução favorável: pacientes vivos sem evidência de melanoma ou mortos por outras causas;
- 2- Evolução desfavorável: pacientes vivos com evidência de melanoma (recidiva local, regional ou à distância) e mortos por melanoma (FRANCKEN, 2004).

O período de seguimento dos pacientes variou de oito meses a seis anos.

### 3.2.2 Variáveis Anatomopatológicas

As lâminas dos pacientes, arquivadas no serviço de Anatomia Patológica do Hospital Erasto Gaertner, foram revistas independentemente por dois dermatopatologistas (Dra. Almut Böer e Dra. Juliana Elizabeth Jung) para



confirmação diagnóstica de melanoma cutâneo cujo diagnóstico foi baseado em critérios bem estabelecidos (ACKERMAN, 1980; MASSI & LeBOIT, 2004). Através da análise das lâminas histológicas foram tabulados os seguintes dados anatomopatológicos:

1. espessura da lesão (índice de Breslow);
2. nível de Clark;
3. número de mitoses;
4. presença de ulceração;
5. regressão;
6. satelitose.

O índice de Breslow foi avaliado em milímetros desde a camada granular da epiderme até a célula tumoral mais profunda e, de acordo com esta medida, os casos foram divididos em melanomas finos (Grupo I), com medida menor ou igual a 1,0 mm e melanomas grossos (Grupo II), com medida maior que 1,0 mm.

O nível de Clark foi dividido em:

Nível I: tumor intra-epidérmico, com membrana basal intacta;

Nível II: presença de invasão da derme papilar;

Nível III: preenchimento de toda a derme papilar pelo tumor até a junção derme papilar/derme reticular;

Nível IV: invasão da derme reticular

Nível V: invasão do tecido subcutâneo

O número de mitoses foi contado por 10 campos de grande aumento (CGA).

Ulceração foi considerada presente quando não havia epiderme intacta sobre o tumor primário.

A presença de regressão foi definida como substituição de tecido tumoral por fibrose, células neoplásicas degeneradas, proliferação de linfócitos e formação telangiectásica.

Lesões satélites foram definidas como presença de ninhos de células tumorais separados do corpo do tumor primário por colágeno normal da derme reticular ou por tecido subcutâneo.

### 3.3 ANÁLISE GENÉTICA MOLECULAR

#### 3.3.1 Isolamento do DNA

A partir dos blocos de parafina dos casos selecionados foram retirados cortes corados com a coloração de rotina (HE) e cortes em branco com 10 µm de espessura. As lâminas coradas foram analisadas para a localização de região representativa do tumor, que foi marcada com caneta de retroprojeção. Através do sistema de espelho, a lâmina marcada foi utilizada para localização da região na lâmina em branco.

As lâminas em branco foram incubadas em xileno por 30 minutos e em uma série de 100, 80, 60 e 40% de etanol e água, 10 segundos cada, a temperatura ambiente. O material correspondente ao tumor (aproximadamente 1 mm<sup>2</sup> de cada amostra) foi microdissecado manualmente da lâmina em branco, colocado em microtubos e submetido à “semi-micro-digestão” utilizando-se 2 µl de buffer para digestão (10µl Proteinase K/90 µl 1x PCR buffer; QIAGEN). Após 15 minutos, os produtos resultantes da digestão desses extratos foram completados com um volume total de 100 µl deste buffer e incubados a 55°C por 24 h. Após a inativação da Proteinase K (95°C/8 min) e centrifugação por 10 minutos para remoção de debris, as amostras de DNA obtidas através deste processo foram diretamente utilizadas para os estudos genéticos subsequentes. O mesmo processo foi utilizado para o preparo de amostras de DNA provenientes de pele normal em todas as amostras.

#### 3.3.2 Detecção de mutações BRAF

A técnica utilizada neste estudo para detecção de mutações no gene BRAF foi a TaqMan RT-PCR, ou seja, “real time polymerase chain reaction”, também chamada “quantitative real time polymerase chain reaction” (Q-PCR/qPCR), que

simultaneamente amplifica e quantifica uma sequência específica de uma amostra de DNA. O procedimento segue os princípios gerais da reação em cadeia da polimerase, mas o DNA amplificado é quantificado enquanto o mesmo se acumula na reação e em tempo real, após cada ciclo de amplificação. Esse sistema é baseado no uso de uma sonda dirigida contra uma região interna da sequência que se deseja amplificar e que tem dois fluorocromos, um em cada extremidade da sonda (um DNA de fita simples). Na extremidade 5' há um fluorocromo que só fluoresce se estiver distante fisicamente do fluorocromo na posição 3'. Este segundo fluorocromo funciona como capturador de energia e não deixa com que a energia luminosa usada para excitar a sonda chegue em quantidade suficiente para excitar o primeiro fluorocromo. Quando o primer hibridiza na região 5', a sonda também o faz no meio da sequência. À medida em que a Taq polimerase avança sintetizando a fita nova, ela vai degradando a sonda à sua frente, liberando o fluorocromo da sonda e permitindo que absorva energia e emita luz. A energia para a excitação dos fluorocromos provém de um feixe de laser que atravessa a amostra e o equipamento que faz isto se chama PCR em tempo real (*real time PCR*) ou Taqman. A medição da radiação é feita pelo aparelho, que traça um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo de PCR.

Primeiramente, a TaqMan RT-PCR foi utilizada para identificar mutações V599E no éxon 15 do gene BRAF de acordo com método modificado de Smyth et al. (SMYTH, 2005). Os primers e as sondas utilizados foram os seguintes:

1. BRAF-For: 5'-CATGAAGAC CTCACAGTAAAAATAGGTGAT-3';
2. BRAF-Rev: 5'-GGATCCAGACA ACTGTTCAAAGTGA-3';
3. HEX-5'-CCATCGAGATTTCACTGTAG-3'-TAMRA (BRAF- WT);
4. FAM-5'-CCATCGAGATTTCTCTGTAG-3'-TAMRA (BRAF-V599E - MUT).

A amplificação e a análise RT-PCR foi realizada em um ciclador IQ5-Cycler (BioRad Laboratories, Inc.) por 50 ciclos. Em cada ciclo, repetiram-se as seguintes temperaturas:

1. 95°C por 3 minutos para desnaturação, ou seja, separação das fitas duplas de DNA;
2. 59°C por 1 minuto para o anelamento (hibridização) dos pares de bases nas suas sequências complementares e para a extensão, ou seja, quando a Taq polimerase adere a cada primer e sintetiza uma nova fita de DNA.

A reação de PCR no Taqman emprega em geral apenas duas temperaturas

(95°C para desnaturação e 59°C, para hibridização e extensão) e o resultado da PCR pode ser dado em menos de 30 minutos.

As reações RT-PCR foram realizadas com uma mistura para reações de 25 µl contendo:

1. 1 x IQ Supermix (BioRad Laboratories, Inc.);
2. 500 nM de cada primer;
3. 200 nM de cada sonda e;
4. aproximadamente 40-90 ng de DNA total (concentrações finais).

Cada amostra foi analisada duas vezes. Os resultados desta análise foram também verificados pelo sequenciamento direto dos produtos de PCR do éxon 15 em seis amostras BRAF V599E positivas, 17 amostras BRAF “wild-type” (WT), três amostras BRAF V599K e seis amostras de pele normal (Apêndice 1). Amostras para as quais os sinais fluorescentes (HEX) foram insuficientes, inexistentes ou apenas BRAF-V599E - WT foram obtidas pelos ensaios RT-PCR foram amplificadas e posteriormente sequenciadas para o éxon 15 do gene BRAF.

A amplificação do éxon 15 foi realizada usando os primers descritos por Davies et al. (DAVIES; 2002):

1. Éxon 15-For: TCATAATG CTTGCTCTGATAGGA-3’;
2. Éxon 15-Rev: 5’-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3’.

As reações de sequenciamento foram realizadas com 50 µl de mistura para reações composta por:

1. 1 x buffer para reação HotStarTaq, Qiagen;
2. 1,2 µM de cada primer;
3. cerca de 40-60 ng de DNA total ;
4. 200 µM de cada dNTP (deoxinucleotídeo trifosfato). ;
5. 2,5 unidades HotStarTaq DNA polimerase, Qiagen).

O perfil térmico foi:

1. 95°C/15 min (1 ciclo);
2. 94°C / 20 seg; 56°C/30 seg; 72°C/30 seg (50 ciclos)
3. 72°C/8 mim (1 ciclo).

Os produtos de PCR foram purificados (GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Reino Unido) e sequenciados em sequenciador automático ABI 377 Automater Suquecer (Applied Biosystems, EUA) utilizando o BigDye Terminator Cycle Sequency Chemistry ( Applied Biosystems, EUA).

Para o início da reação de sequenciamento é necessário saber apenas as sequências das extremidades do trecho a ser sequenciado. O precursor normal da síntese de DNA é o dNTP, ou deoxinucleotídeo trifosfato, que apresenta uma hidroxila na posição 3'. É a partir desta hidroxila que a fita nascente é estendida. Em reações de sequenciamento, utiliza-se um dideoxinucleotídeo trifosfato, ou ddNTP, que não tem esta hidroxila. Logo, se for incorporado a uma fita de DNA, interrompe a incorporação de outros nucleotídeos a partir dele. Se o ddNTP for marcado associado à radiação ou fluorescência, a fita interrompida ficará radiotiva ou fluorescente e poderá ser detectada mais facilmente. Neste estudo, cada dideoxibase foi marcada com uma fluorescência diferente. Portanto, as fitas terminadas em A, T, G ou C emitiram cores diferentes quando excitadas com luz de um feixe de laser.

A reação de sequenciamento começou sempre exatamente da mesma base, a partir do DNA molde que adicionamos à reação, devido a presença do primer que sempre parecia exatamente na posição esperada, jamais uma base antes ou uma depois. Por isso, todas as fitas estendidas a partir deste primer iniciam rigorosamente na mesma base, a partir do primer e copiando a fita molde.

Como existem inúmeras moléculas de DNA na reação, a extensão da fita pode terminar em qualquer posição, o que resulta em coleções de DNA de diferentes comprimentos. As fitas assim produzidas foram separadas pelo tamanho em eletroforese de poliacrilamida, e a base final da sequência da fita foi identificada pela fluorescência emitida quando a banda eletroforética correspondente à fita cruzou o ponto do gel que era iluminado por um feixe de laser. Cada deoxinucleotídeo emite uma luz colorida de comprimento de onda característico que é gravado como uma banda colorida. A fluorescência emitida pela passagem de uma banda pela janela de medição é registrada por um sistema de microcâmaras sensoras conectadas a um programa de computador, que por sua vez transforma o sinal num gráfico, conhecido como eletroferograma, com picos coloridos representando cada base na sequência.

As sequências foram processadas utilizando a versão BioEdit 5.0.9 e identificadas usando a procura NCBI/BLAST: National Center for Biotechnology Information/ Basic Local Alignment Search Tool em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (NCBI, Bethesda, EUA).

### 3.3.3 Detecção da mutação c-Kit

TaqMan RT-PCR foi utilizada para identificar mutações L576P do c-Kit. Os primers e as sondas foram desenvolvidos utilizando o Primer3Plus:

1. C-Kit-For: 5'-CAGTGGAAAGGTTGTTGA GGA -3';
2. C-Kit-Rev: 5'-GCCTGTTTCTGGGAAACTCC -3';
3. HEX-5'-CCCAACACAA CTCCTTATGATC -3'-TAMRA (C-KIT-WT);
4. FAM-5'-CCCAACACAACCTCCTTATGA TC -3'-TAMRA (C-KIT-L576P-MUT).

Amplificação e análise RT-PCR foi realizada como descrito acima com pequenas modificações (temperatura de anelamento de 61 °C, 400 nM de cada primer, 250 nM de cada sonda (concentrações finais)

Os resultados da análise RT-PCR também foram verificados pelo sequenciamento direto de alguns produtos do c-Kit , n= 12 e quatro amostras de pele normal (Apêndice 2).

Amostras para as quais nenhum sinal ou sinal insuficiente foram obtidos pelos ensaios de PCR (WT e MUT) foram amplificadas usando os primers acima e então sequenciadas. Uma amostra de adenocarcinoma de trato gastro intestinal com a mutação L576P serviu como controle positivo.

## 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para estimar possíveis diferenças entre variáveis contínuas de distribuição normal foi aplicado o teste paramétrico t de Student para amostras independentes. Para variáveis contínuas de distribuição assimétrica foi aplicado o teste não paramétrico de Man - Whitney.

A diferença entre as freqüências foi testada através do Teste qui-quadrado de Pearson e do Teste Exato de Fisher. Valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

O modelo de regressão logística univariada foi aplicado para estimar a

probabilidade de mutação de acordo com a idade e a curva de Kaplan-Meier foi construída para estimar a taxa de sobrevivência.

Para todos foram utilizados os testes bicaudais, considerando que as diferenças poderiam estar distribuídas para ambos os lados da curva, com nível de significância mínimo de 5%.

O tamanho da amostra foi estimado considerando um erro de tipo I de 5% (alfa) e erro do tipo II de 10%, com um poder com um poder de teste estimado mínimo de 90%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO GERAL DAS AMOSTRAS DE MELANOMAS CUTÂNEOS

Constituíram a amostra deste estudo 96 pacientes com melanoma cutâneo primário, divididos em dois grupos principais: Grupo I - 27 pacientes (28,1%) portadores de melanomas finos ( $\leq 1$  mm) considerados de baixo risco e Grupo II - 69 pacientes (71,9%) portadores de melanomas classificados como grossos ( $> 1$  mm); considerados de alto risco para progressão da doença.

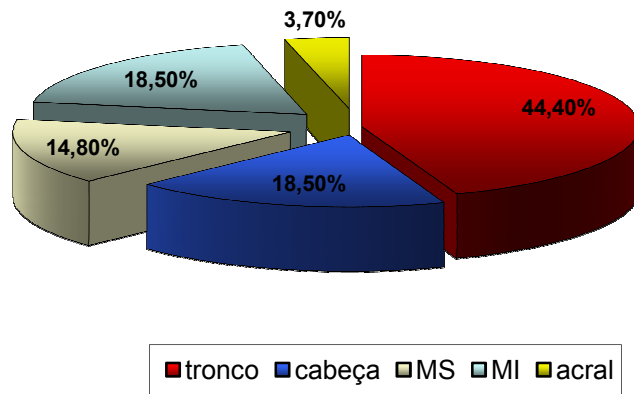
#### 4.1.1 Grupo I – Melanomas Finos

Vinte e sete pacientes apresentaram melanomas com espessura igual ou inferior a 1 mm, sendo 17 (63,0%) do sexo feminino e 10 (37,0%) do sexo masculino; com média de idade de  $48,9 \pm 16,8$  anos ( $50,5 \pm 12,7$  anos para pacientes do sexo feminino e  $46,2 \pm 22,7$  anos para os do sexo masculino;  $p = 0,43$ ).

No gráfico 1 está ilustrada a localização da lesão nos pacientes do grupo I, que foi dividida em tronco, cabeça, membros superiores (MS), membros inferiores (MI) e acral (mãos e pés).

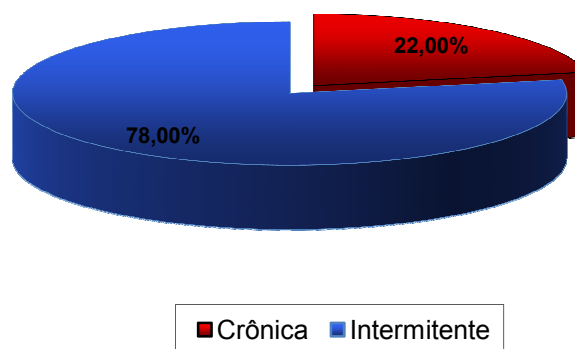


GRÁFICO 1 – LOCALIZAÇÃO DOS MELANOMAS NOS PACIENTES DO GRUPO I



No gráfico 2 está ilustrada a frequência da lesão de acordo com a exposição ao sol nos pacientes do grupo I.

GRÁFICO 2 – FREQUÊNCIA DOS MELANOMAS DE ACORDO COM A EXPOSIÇÃO AO SOL NOS PACIENTES DO GRUPO I



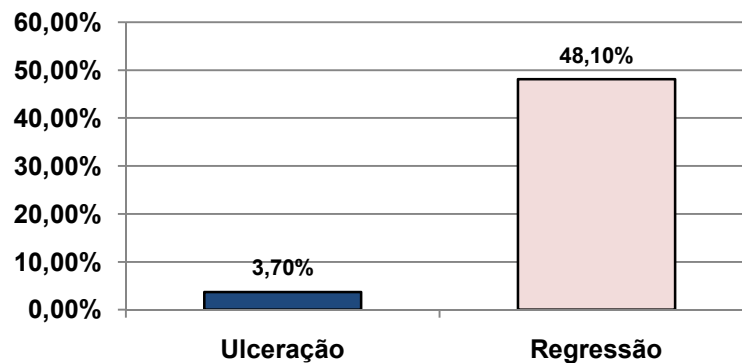
O índice de Breslow foi em mediana de 0,5mm , variando de 0,2 a 1,0 mm. O nível de Clark foi de II em 25 casos (92,6%), de III em 1 caso (3,7%) e de IV em 1 caso (3,7%).

Em todos os casos o número de mitoses foi menor que 6 por 10 CGA.

As frequências observadas de ulceração e regressão estão apresentadas no gráfico 3. Treze casos apresentaram regressão, um caso ulceração e em nenhum dos casos deste grupo foi observada satelitose.

GRÁFICO 3 - FREQUÊNCIA DE ULCERAÇÃO E REGRESSÃO OBSERVADAS NO GRUPO

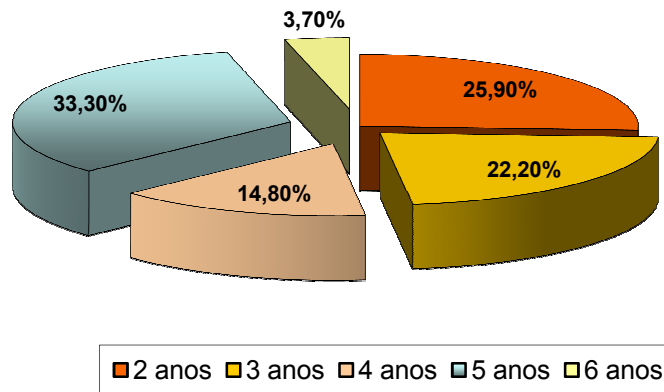
I



A avaliação da evolução clínica destes pacientes até o fechamento do estudo, mostrou que todos estavam vivos, sendo que dos 27 pacientes, dois apresentavam evidência de doença e foram considerados como evolução desfavorável (7,4%).

O tempo de acompanhamento dos pacientes deste grupo variou de 2 a 6 anos. O gráfico 4 ilustra o tempo de acompanhamento.

GRÁFICO 4 – TEMPO DE ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES DO GRUPO I

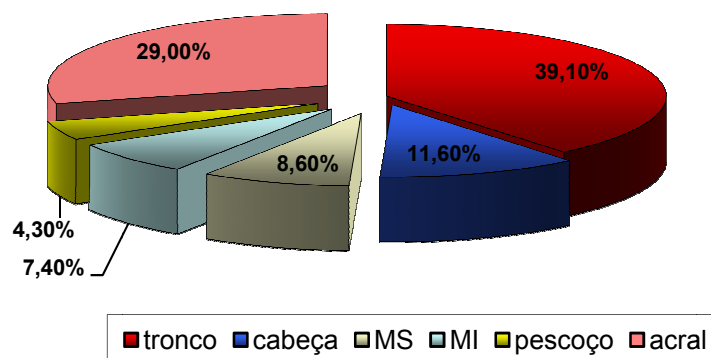


#### 4.1.2 Grupo II – Melanomas Grossos

Sessenta e nove pacientes apresentaram melanomas com espessura superior à 1 mm, sendo 31 (45,0%) do sexo feminino e 38 (55,0%) do sexo masculino; com média de idade de 54,6 + 17,3 anos (50,2 + 17,6 anos para pacientes do sexo feminino e 58,2 + 3,9 anos para os do sexo masculino;  $p = 0,05$ ).

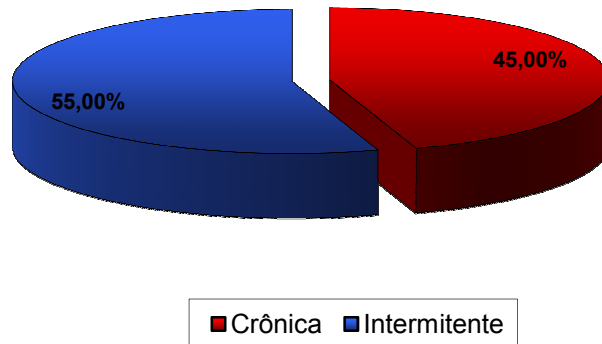
No gráfico 5 está ilustrada a localização da lesão nos pacientes do grupo II.

GRÁFICO 5 – LOCALIZAÇÃO DOS MELANOMAS NOS PACIENTES DO GRUPO II



No gráfico 6 está ilustrada a frequência da lesão nos pacientes do grupo II, de acordo com as áreas de exposição ao sol. O caso número 9 que corresponde a melanoma acral, localiza-se em dorso de mão, portanto foi considerado no grupo sujeito à exposição solar crônica.

GRÁFICO 6 – FREQUÊNCIA DOS MELANOMAS DE ACORDO COM A EXPOSIÇÃO AO SOL NOS PACIENTES DO GRUPO II

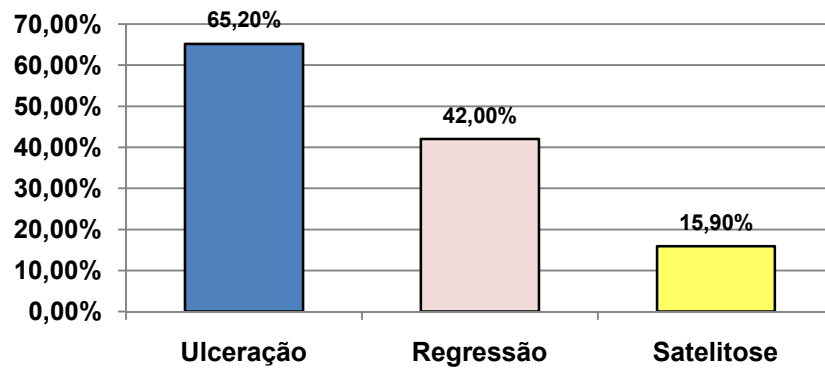


O índice de Breslow foi em mediana de 4,2 mm, variando de 1,0 a 15,0 mm; enquanto o índice de Clark foi de II em 16 casos (23,2%), de III em 23 casos (33,3%), de IV em 19 casos (27,5%) e de V em 11 casos (15,9%).

Em 57 (82,6%) casos, o número de mitoses observado foi menor ou igual a seis. Em 12 (17,40%), foi maior que seis.

As frequências observadas de ulceração, regressão e satelitose estão apresentadas no gráfico 7.

GRÁFICO 7 – FREQUÊNCIA DE ULCERAÇÃO, REGRESSÃO E SATELITOSE OBSERVADAS NO GRUPO II



Quarenta e cinco pacientes estão vivos (65,21%) e 24 (36,23%) foram à óbito. A tabela ilustra a condição de atividade da doença nas duas categorias (tabela 1). Quarenta pacientes (58,0%) foram classificados como evolução favorável e 29 (42,0%) como evolução desfavorável.

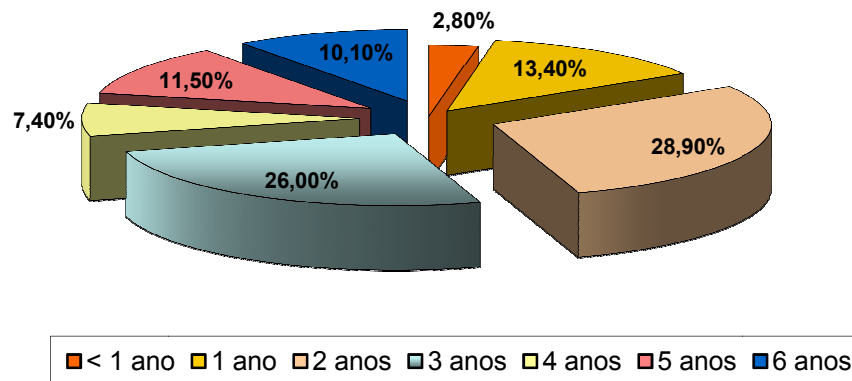
TABELA 1 – EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES DO GRUPO II

	Vivo	Óbito
Com doença	14	15
Sem doença	31	09
Total	45	24

FONTE: O autor (2010)

O Gráfico 8 ilustra o tempo de acompanhamento, que variou de 8 meses a 6 anos.

GRÁFICO 8 – TEMPO DE ACOMPANHAMENTO NO GRUPO II



## 4.2 AVALIAÇÃO DOS DADOS DE PCR DOS MELANOMAS CUTÂNEOS

### 4.2.1 Mutações BRAF

Mutações no éxon 15 do gene BRAF foram encontradas em 38 (39,58%) espécimens de melanoma cutâneo primário. A maioria das mutações identificadas foram transversões T1796A, que modificaram o códon “wild-type” GTG (valina) para GAG (glutamato) na posição V599 (V599E). No presente estudo esta transversão Val599Glu correspondeu a 92,1% (35 de 38) de todas as mutações.

Três casos (7,89%) apresentaram a substituição do nucleotídeo GT1795AA, que alterou o códon “wild-type” GTG (valina) para AAG (lisina) na posição 599 (V599K).

De 15 lesões metastáticas que foram avaliadas, seis (40%) apresentaram mutações do gene BRAF. A tabela 2 mostra os casos com mutação do gene BRAF nas lesões primárias e suas metástases pareadas.

TABELA 2 - MUTAÇÕES BRAF EM LESÕES PRIMÁRIAS E SUAS METÁSTASES  
CORRESPONDENTES

Caso	BRAF - Lesão primária	BRAF - Metástase
15 ( Fino)	Presente : T1796A - V599E	Presente: T1796A - V599E
25 ( Fino)	Presente:T1796A - V599E	Ausente
12	Presente: T1796A - V599E	Presente: T1796A - V599E
13	Presente: T1796A - V599E	Ausente
16	Presente: T1796A - V599E	Presente: T1796A - V599E homozigota
23	Ausente	Ausente
32	Ausente	Ausente
40	Ausente	Ausente
41	Ausente	Ausente
54	Ausente	Ausente
56	Presente: T1796A - V599E	Não avaliável
57	Ausente	Presente: T1796A - V599E
61	Ausente	Presente: T1796A - V599E
62	Presente: T1796A - V599E	Presente: T1796A - V599E
67	Ausente	Não avaliável

FONTE: O autor (2010)

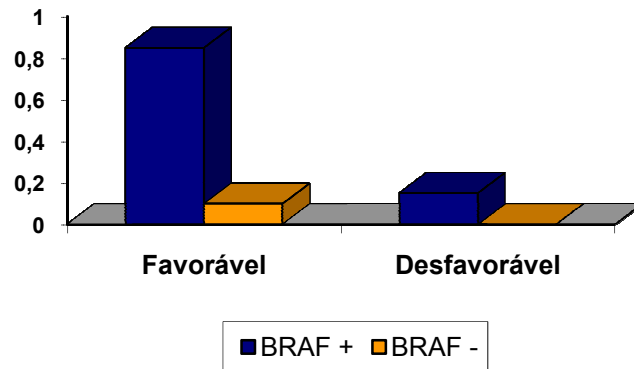
Perda de heterozigidade foi identificada em três melanomas cutâneos primários e em um melanoma metastático, todos na posição V599E.

No total, em quatro amostras a amplificação falhou: duas amostras de lesões primárias (casos 9 e 11 - melanomas finos) e duas amostras de lesões metastáticas (casos 56 e 67 – melanomas grossos).

Nos melanomas finos, a mutação BRAF foi observada em 12 casos (44,5%). Dois destes casos apresentaram metástases em sua evolução e a mutação foi encontrada em um deles. Em três casos observou-se a presença de nevo associado ao melanoma, e a mutação foi encontrada em dois deles .

Como se observa no gráfico 9, a associação entre presença da mutação BRAF e o prognóstico dos pacientes com melanomas finos não apresentou significância estatística ( $p=0,48$ ).

GRÁFICO 9 – ASSOCIAÇÃO ENTRE MUTAÇÃO BRAF E PROGNÓSTICO NOS MELANOMAS FINOS

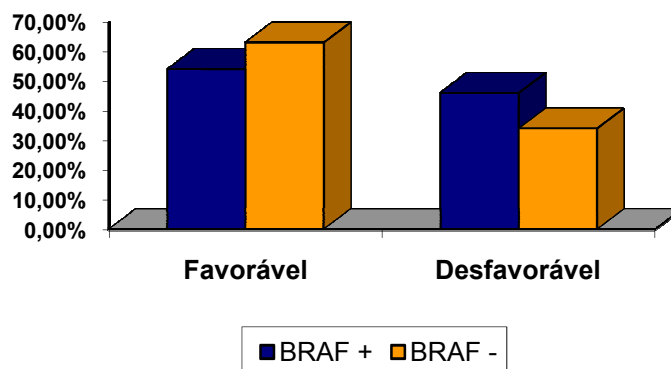


Teste Exato de Fisher –  $p = 0,48$

Nos melanomas grossos, a mutação BRAF foi observada em 26 casos (37,7%) e em cinco (7,2%) das 13 lesões metastáticas deste grupo. Nevos associados foram registrados em três casos (4,3%) e a mutação foi encontrada em dois deles.

No gráfico 10 observa-se a associação entre mutação BRAF e prognóstico no melanoma grosso, que não apresentou significância estatística ( $p=0,45$ ).

GRÁFICO 10 – ASSOCIAÇÃO ENTRE MUTAÇÃO BRAF E PROGNÓSTICO NOS MELANOMAS GROSSOS

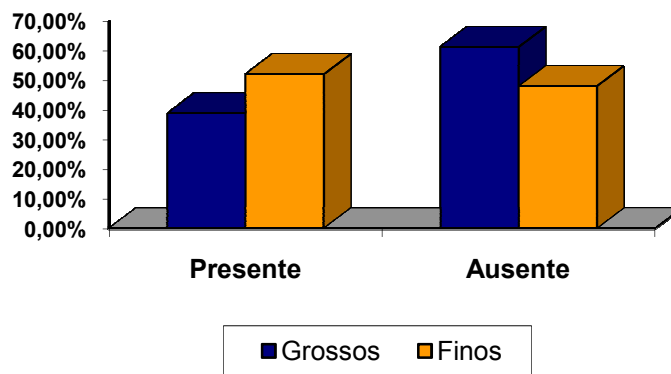


Teste Exato de Fisher –  $p = 0,45$



O gráfico 11 ilustra a frequência de mutação BRAF nos grupos de melanomas finos e grossos.

GRÁFICO 11 – FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO BRAF NOS GRUPOS I E II



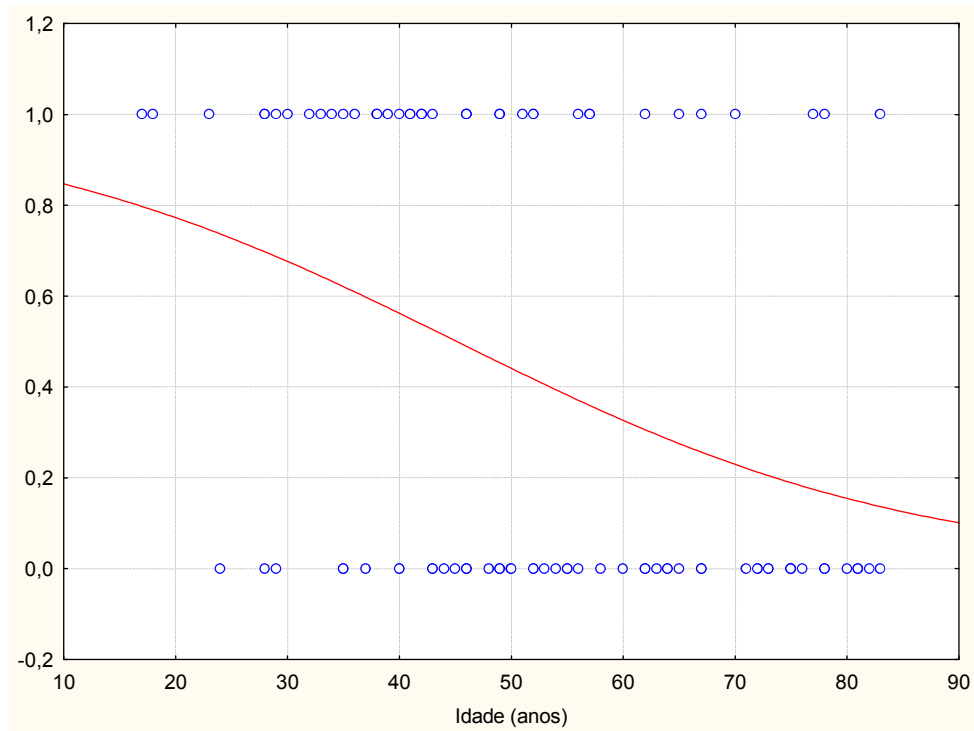
Teste Exato de Fisher –  $p = 0,47$

Não se observa diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos em relação à presença da mutação BRAF na lesão primária ( $p = 0,47$ ), presença da mutação BRAF na lesão metastática ( $p = 1,00$ ) e presença de nevo associado ao melanoma cutâneo ( $p = 0,34$ ).

#### 4.2.1.1 Comparação entre os melanomas com e sem mutações BRAF

Observa-se entre os pacientes com mutação BRAF menor idade do que naqueles sem mutação (45,6 + 16,2 anos versus 57,4 + 15,8 anos,  $p < 0,001$ ). O gráfico 12 mostra que a probabilidade de mutação BRAF diminui com o aumento da idade. Por exemplo, a probabilidade de mutação com 50 anos é de cerca de 40% e se eleva para cerca de 80% com 20 anos.

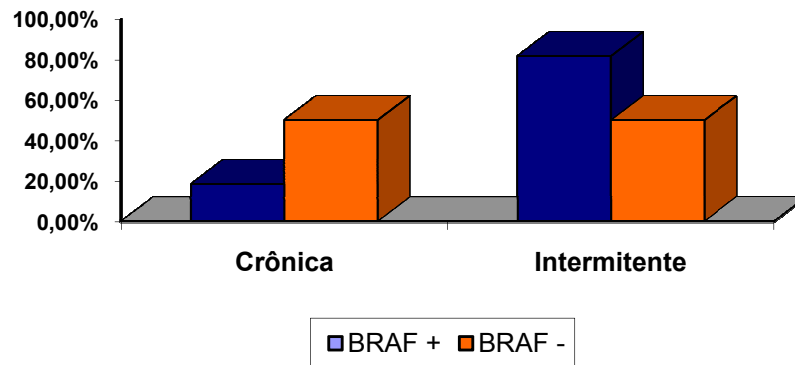
GRÁFICO 12: PROBABILIDADE DE MUTAÇÕES BRAF DE ACORDO COM A IDADE



Na comparação dos grupos com e sem mutação, não se observa diferença estatística significativa em relação ao sexo, com proporções semelhantes de mutação em ambos os sexos ( $p= 1,00$ ).

No gráfico 13 está ilustrada a distribuição dos grupos com e sem mutações, de acordo com as áreas de exposição ao sol.

GRÁFICO 13 – DISTRIBUIÇÃO DOS MELANOMAS NOS GRUPOS COM E SEM MUTAÇÕES EM RELACAO À EXPOSICAO AO SOL

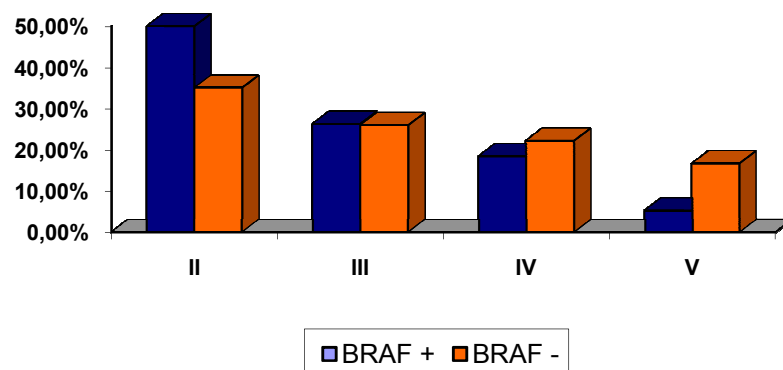


Teste Qui-quadrado de Pearson –  $p < 0,001$

O índice de Breslow foi semelhante entre os grupos (com mutações :1,5 mm; variando de 0,3 a 13,0 versus sem mutações: 2,7 mm; variando de 0,2 a 15,0;  $p = 0,23$ ).

Observa-se no gráfico 14 a distribuição do índice de Clark nos dois grupos. Não se verifica predomínio significativo do nível de Clark em um dos grupos.

GRÁFICO 14 – DISTRIBUIÇÃO DO NÍVEL DE CLARK NOS GRUPOS COM E SEM MUTAÇÕES

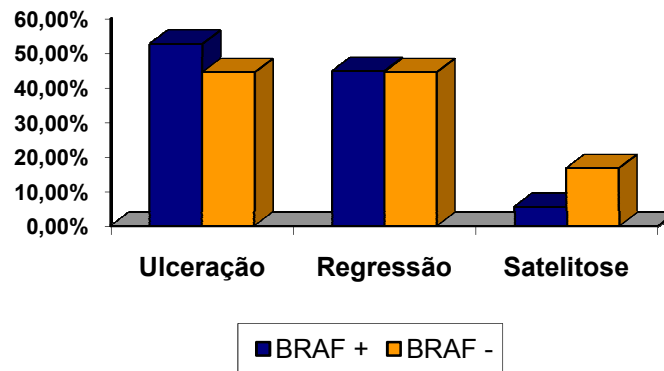


Teste Qui-quadrado de Pearson –  $p = 0,28$

Não se observa diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao número de mitoses ( $p = 0,54$ ).

As freqüências observadas de ulceração, regressão e satelitose estão apresentadas no gráfico 15. Não há significância estatística entre esses parâmetros e a presença de mutações BRAF ( $p > 0,05$ ).

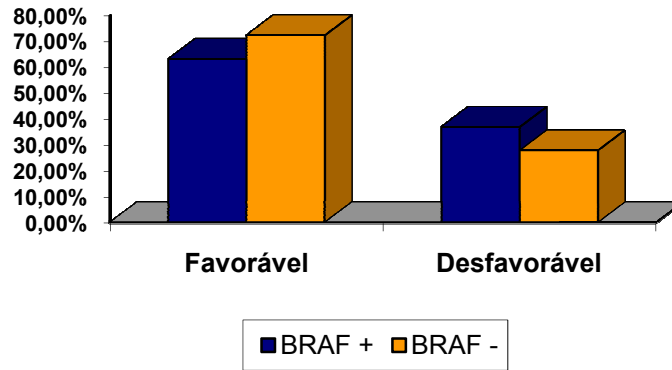
GRÁFICO 15 – FREQUÊNCIA DE ULCERAÇÃO, REGRESSÃO E SATELITOSE OBSERVADAS NOS GRUPOS COM E SEM MUTAÇÕES



Teste Qui-quadrado de Pearson –  $p > 0,05$

No gráfico 16 observa-se a associação entre mutação BRAF e prognóstico, que não foi significativa ( $p=0,37$ ).

GRÁFICO 16 – ASSOCIAÇÃO ENTRE EVOLUÇÃO CLÍNICA E MUTAÇÕES BRAF

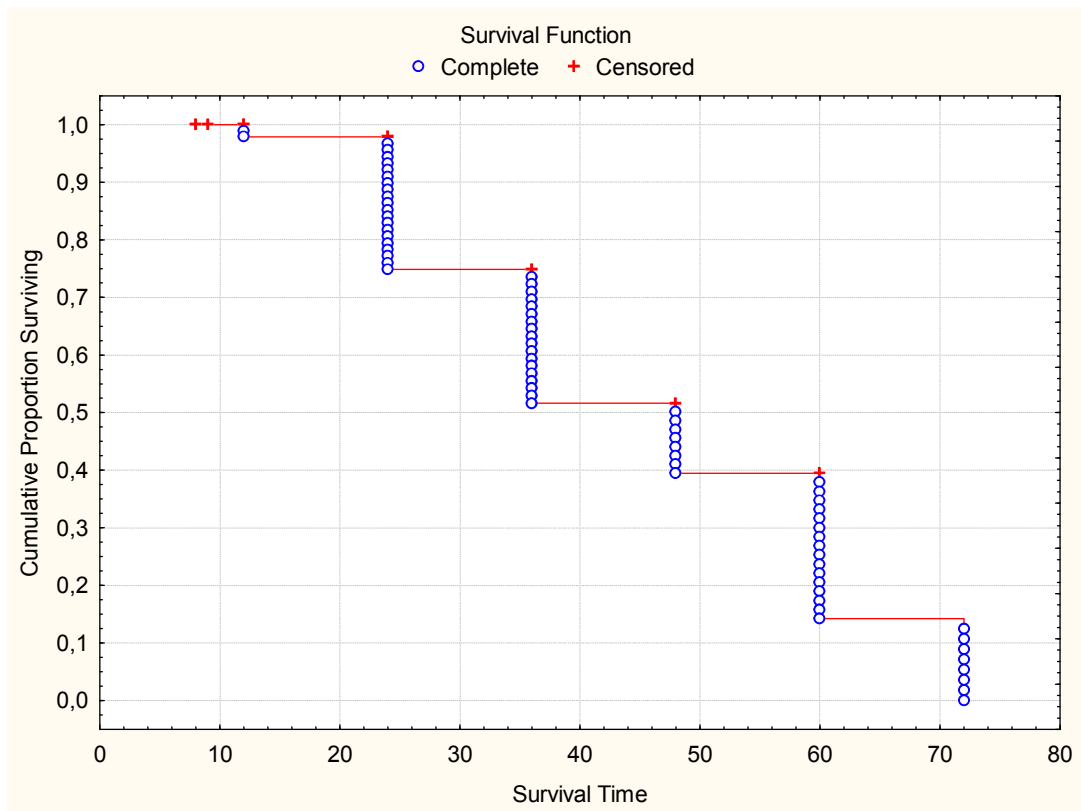


Teste Exato de Fisher –  $p = 0,37$

#### 4.2.1.2 Curvas de sobrevivência de Kaplan - Meier

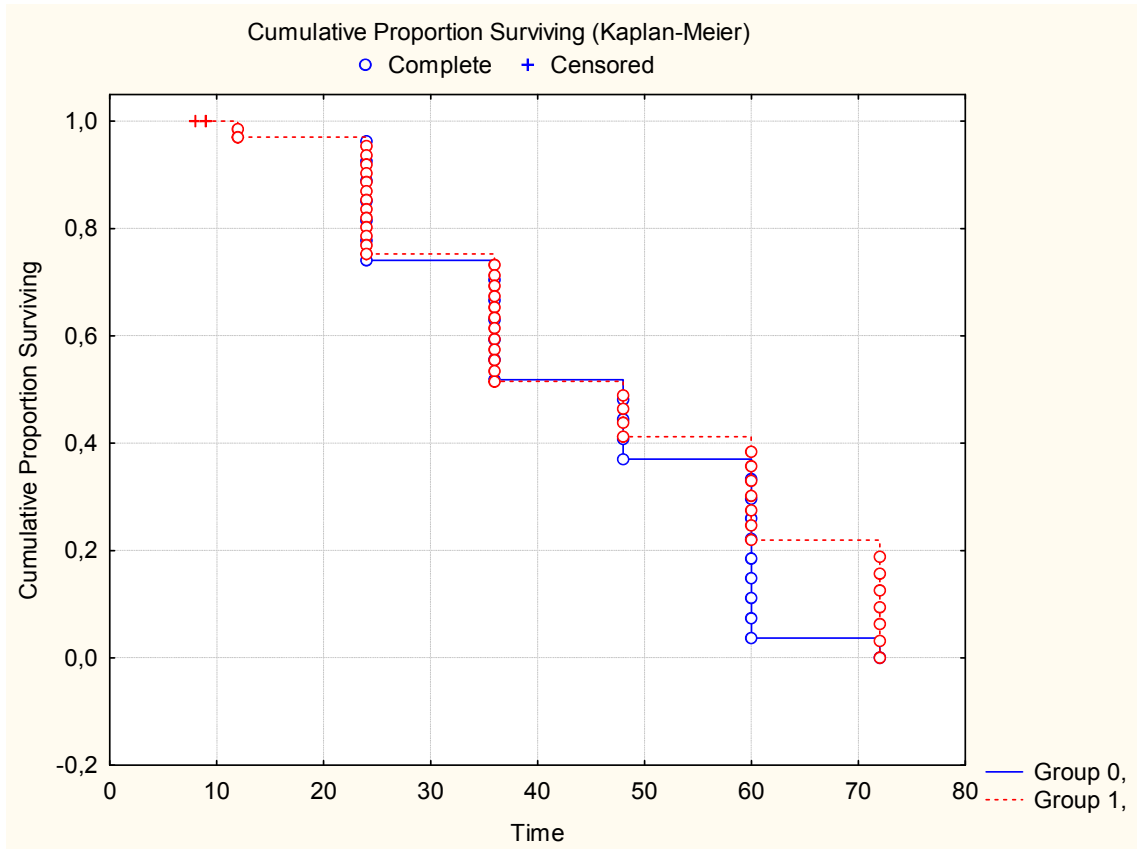
O gráfico 17 ilustra a curva de sobrevivência considerando todos os pacientes estudados. O tempo de sobrevivência está representado em meses.

GRÁFICO 17 - CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE TODOS OS PACIENTES COM MELANOMA CUTÂNEO



O gráfico 18 ilustra a curva de sobrevivência considerando os dois grupos de pacientes, grupo I - melanomas finos - representado no gráfico como Grupo 0 e grupo II - melanomas grossos- representado no gráfico como Grupo 1. O tempo de sobrevivência está tabulado em meses.

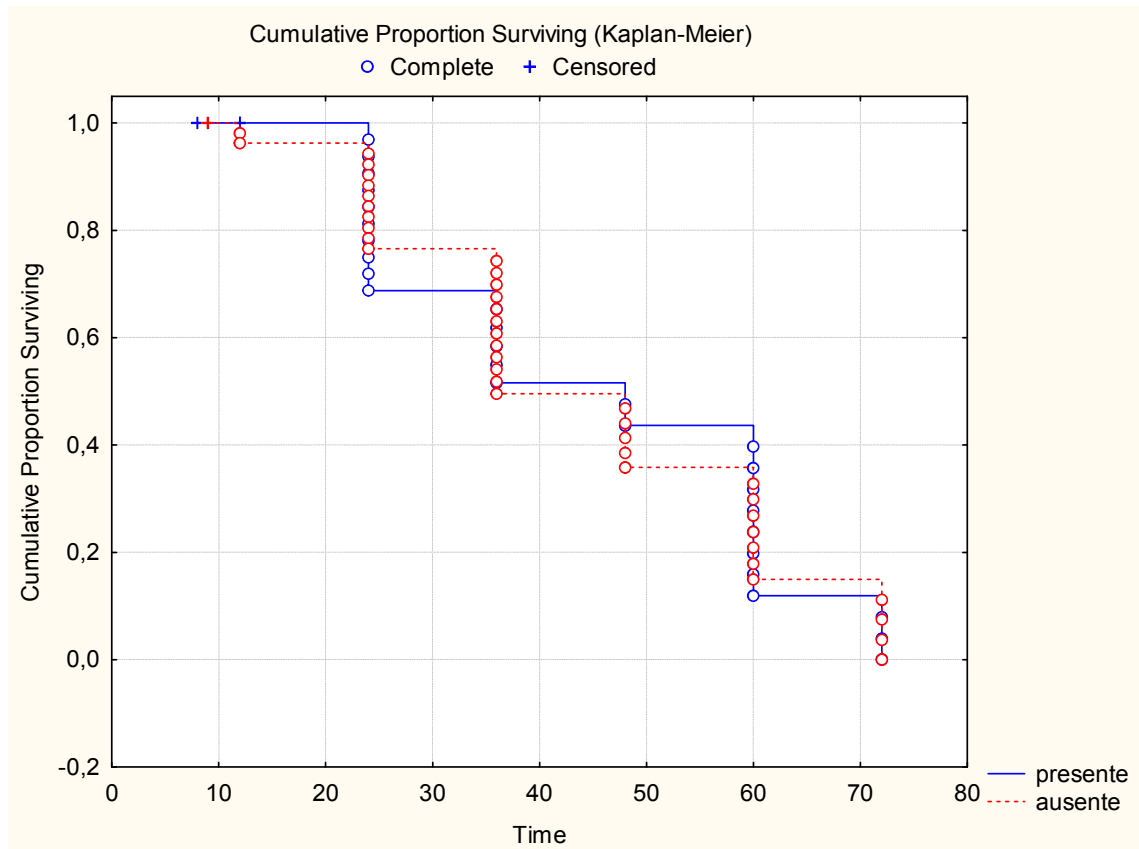
GRÁFICO 18 - CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES DO GRUPO I E II



Quando se compara a sobrevivência de acordo com o tipo de melanoma não existe diferença significativa, as sobrevivências são semelhantes ( $p = 0,68$ ).

O gráfico 19 ilustra a curva de sobrevivência considerando a presença ou não de mutação. O tempo de sobrevivência está tabulado em meses.

GRÁFICO 19 - CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES COM E SEM MUTAÇÃO BRAF



Quando se compara a sobrevivência de acordo com a presença ou não das mutações BRAF, também não há diferença significativa, as sobrevivências são semelhantes ( $p = 0,93$ ).

Nos apêndices 3 e 4 estão tabulados todos os dados clínicos, anatomopatológicos e de PCR da mutação BRAF avaliados neste estudo.

#### 4.2.2 Mutações c-Kit

Os noventa e seis espécimens de melanomas cutâneos primários, bem como 15 lesões metastáticas correspondentes foram também avaliadas para a mutação c-Kit L576P, que não foi identificada em nenhum caso (0%).



Em quatro casos, pele normal também foi analisada e nenhuma mutação foi encontrada.

A amplificação falhou em quatro casos, e em três destes casos, a mutação BRAF também não pode ser avaliada.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES BRAF

Neste estudo foi detectada a presença de mutações no éxon 15 do gene BRAF em 38 (39,58%) de 96 espécimens de melanomas cutâneos primários. Esta frequência é relativamente menor do que frequências reportadas em estudos anteriores (DAVIES, 2002; OMHOLT, 2003; THOMAS, 2004; GOYDOS, 2005; GOEL, 2006; VIROS, 2008), mas frequências menores ainda que a deste estudo também já foram relatadas (DONG, 2003; MALDONADO, 2003); SHINOZAKI, 2004; SASAKI, 2004; DEICHMANN, 2004; LANG, 2005; SALDANHA, 2006; POYNTER, 2006; DEICHMANN, 2006). Neste contexto, é importante ressaltar que a maioria dos artigos publicados incluiu em sua amostragem menos do que 60 casos. Mutações BRAF não foram detectadas em uma significativa proporção de melanomas cutâneos primários e metastáticos e, na literatura atual, a maioria dos estudos, incluindo o nosso, apresentam frequência de mutações menores que 50%. As baixas frequências de mutações BRAF nos leva a acreditar que essas mutações não sejam um fator fundamental na tumorigênese do melanoma ou que talvez não estejam relacionadas com início da progressão tumoral. O mesmo foi observado por Shinozaki et al. que relataram baixas frequências de mutações BRAF tanto em melanomas cutâneos primários (31%) como em melanomas metastáticos (57%) (SHINOZAKI, 2004). A partir desses resultados, nós acreditamos que existam caminhos ou vias genéticas alternativas relacionadas com o melanoma e mutações específicas do gene BRAF representam apenas uma das alterações genéticas possíveis que podem contribuir com o desenvolvimento desta neoplasia.

A mutação V599E representa a maioria das mutações BRAF em melanomas e é responsável pelo aumento da atividade BRAF kinase. O número sequencial da mutação V599E é agora referido como V600E, devido a uma discrepância que existe em um códon do éxon 1 na sequência do gene BRAF com número de acesso NM\_004333. A análise desta sequência por Kumar et al. mostrou que a sequência NT\_007914 é a correta (KUMAR, 2003). O banco de genes do Centro Nacional de

Informações Biotecnológicas (National Center for Biotechnology Information - NCBI) renomeou a mutação V599E (T1796A) para V600 (T1799A). Neste estudo mantivemos a numeração V599E, assim como no artigo original sobre mutações BRAF em melanomas de Davies et al. (DAVIES, 2002; NCBI, 2008).

No presente estudo, a mutação V599E (Val599Glu) correspondeu a 92,1% de todas as mutações, encontradas em 35 de 38 casos, similar a outros estudos, onde a vasta maioria das mutações BRAF identificadas foram transversões T1796A (DONG, 2003; OMHOLT, 2003; MALDONADO, 2003; GOYDOS, 2005; DEICHMANN, 2005; LANG, 2005).

A pele normal adjacente à neoplasia também foi investigada e mutações não foram encontradas, indicando que estas foram mutações somáticas adquiridas.

Três casos (7,89%) apresentaram a substituição do nucleotídeo GT1795-96AA, que mudou o códon “wild-type” GTG (valina) para AAG (lisina) na posição 599 (599K).

A BRAF quinase com a mutação Val599Glu apresenta uma atividade maior que B-RAF “wild-type” e ambas as trocas Val599Glu e Val599Lys fazem com que esta proteína-quinase adquira uma capacidade maior de induzir transformação (DONG, 2003). Como a BRAF mutante (V599E) possui uma atividade quinase basal dez vezes maior e induz transformação em células NIH3T3 com eficiência 138 vezes maior que a B-RAF “wild-type”, a associação a desta mutação com desenvolvimento de melanomas é muito provável (DAVIES, 2002). Outras mutações já foram descritas em melanomas cutâneos que resultam em substituições Gly468Ser, Val599Arg e Lys600Glu. Com exceção de Val599Glu e Val599Lys, nenhuma das outras mutações foi analisada funcionalmente e seus efeitos até a presente data, são desconhecidos. Entretanto, devido à semelhança destas mutações com as já conhecidas, elas provavelmente também desempenhem papel importante no desenvolvimento do melanoma (OMHOLT, 2003).

Perda de heterozigidade foi identificada em três melanomas cutâneos primários e em um melanoma metastático, todas na posição V599E. É possível que a deleção do alelo “wild-type” represente uma seleção genética adicional em melanomas agressivos (DONG, 2003):

Em apenas quatro amostras a amplificação falhou, a explicação mais provável para isso pode estar relacionada à baixa qualidade do DNA destas amostras.

## 5.2 CORRELAÇÃO DAS MUTAÇÕES BRAF COM FASE DE CRESCIMENTO E ESPESURA TUMORAL

Em lesões cutâneas melanocíticas, especialmente melanomas, progressão tumoral é relacionada a um acúmulo gradual de alterações genéticas irreversíveis que resultam em aumento do seu comportamento maligno e desenvolvimento de doença metastática e, para fins diagnósticos e prognósticos, é importante identificar marcadores apropriados que diferenciem os estágios da progressão do melanoma, como por exemplo, separar os melanomas finos (em fase de crescimento horizontal/inicial) dos melanomas grossos (fase de crescimento vertical/avançado) (RUITER, 1998).

De acordo com alguns autores, a fase de crescimento radial do melanoma (Radial Growth Phase - RGP) representa casos em que as células neoplásicas estão confinadas à epiderme ou encontram-se presentes tanto na epiderme como superficialmente na derme papilar. Por definição, se as células invadem a derme, os ninhos por elas formados não devem ser maiores do que o maior ninho intraepidérmico e não devem exibir figuras de mitose. Melanomas em fase de crescimento vertical (Vertical Growth Phase - VGP) são aqueles que apresentam um componente dérmico invasivo onde os ninhos ou agregados de células neoplásicas são maiores do que o maior ninho intraepidérmico ou apresentam atividade mitótica significativa (DONG, 2003; OMHOLT, 2003). Melanomas do tipo disseminação superficial são aqueles que apresentam uma fase radial de crescimento com disseminação pagetóide, com ou sem fase vertical de crescimento (MASSI & LEBOIT, 2004).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou os melanomas em quatro subtipos: disseminação superficial, lentigo maligna, nodular e acral lentiginoso. De acordo com Ackerman e LeBoit et al., essa classificação tem pouco valor prognóstico e pouca relevância diagnóstica e é de utilidade limitada na prática clínica (ACKERMAN, 1980; LEBOIT, 2006). Entretanto, controvérsia ainda existe se estes subtipos refletem diferenças biológicas entre eles ou são efeitos secundários que dependem das características da pele nas diferentes localizações anatômicas (MALDONADO, 2003).

Ackerman descreveu uma sequência de eventos em melanomas cutâneos

primários que se inicia com a proliferação de melanócitos solitários em um pequeno foco na camada basal da epiderme e termina com a extensão de melanócitos atípicos horizontalmente dispostos ao longo desta camada, ascensão de melanócitos atípicos acima da camada basal e formação de ninhos na epiderme, quando então melanócitos atípicos invadem a derme. Essas alterações histológicas ocorrem em todo melanoma cutâneo primário, independente da sua localização, seja área coberta do couro cabeludo, área foto-exposta da face, regiões cobertas do tronco e extremidades, palmas e solas ou leito ungueal. Alguns melanócitos atípicos podem eventualmente penetrar o endotélio de vasos sanguíneos ou linfáticos e serem carreados para outros locais próximos ou à distância onde se desenvolverão lesões metastáticas. Essa sequência repetitiva de alterações histológicas é acompanhada por características clínicas que também se repetem em todos os sítios anatômicos. Algumas características clínicas, porém são mais comuns em certos locais do que em outros. De acordo com Ackerman, todos os melanomas cutâneos evoluem de maneira semelhante: inicialmente são horizontais (superficiais) e disseminam-se entre a epiderme e eventualmente estendem-se verticalmente invadindo a derme (ACKERMAN, 1980).

Os autores LeBoit e Massi compartilham a mesma opinião, mas admitem que a distinção em dois padrões de crescimento (RGP/VGP) ainda possui alguma utilidade didática e diagnóstica. Eles utilizam o termo “padrão” de melanoma ao invés de “subtipo” de melanoma. O padrão disseminação superficial é uma forma de melanoma que cresce predominantemente de forma horizontal na epiderme e posteriormente pode envolver a derme papilar e reticular (MASSI, 2004).

O AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC) estratificou a espessura do melanoma em quatro categorias: menor ou igual a 1,0 mm; 1,01-2,0 mm; 2,01- 4,0 mm e maior que 4,01 mm (BALCH, 2001).

Os melanomas com espessura menor ou igual a 1,0 mm são chamados de melanomas finos e os restantes, melanomas grossos (BALCH, 2004). Esta classificação foi aplicada neste estudo porque uma das hipóteses consideradas foi a de que a divisão em melanomas finos e grossos nos permitiria determinar em qual estágio de progressão do melanoma as mutações BRAF ocorrem. Estas foram encontradas em 13 (48,1%) melanomas finos e 26 (37,7%) melanomas grossos e não houve diferença estatística entre esses dois grupos considerando a presença de mutação ( $p > 0,05$ ). Este achado difere do estudo de Dong et al. onde foi encontrada

alta frequência de mutações BRAF em nevos, melanomas em fase vertical de crescimento e melanomas metastáticos, variando de 62 a 71% e uma frequência significativamente menor em melanomas em fase radial de crescimento. Apenas dois de 20 (10%) casos analisados apresentaram mutações. De acordo com os autores, o fato de que melanomas em fase inicial de crescimento exibem uma frequência muito baixa de mutações BRAF sugere que essas mutações podem não estar envolvidas no início do desenvolvimento da grande maioria dos melanomas e ao invés disso refletem eventos relacionados com a progressão da neoplasia e desta maneira poderiam servir como um biomarcador importante para distinção entre as fases de crescimento da lesão, com implicações clínicas e terapêuticas para os pacientes (DONG, 2003)

Em contraste, Thomas et al. encontraram mutações BRAF tanto em melanomas finos (Breslow  $\leq 0,75$  mm) quanto grossos. A presença de mutações em 70% dos casos de melanomas finos mostra que esta mutação é frequente uma vez que células neoplásicas já tenham invadido a derme, mesmo que superficialmente e sugerem que elas já ocorrem em fases iniciais (THOMAS, 2004).

De acordo com os resultados do presente estudo, também concluímos que a mutação já ocorre em fases iniciais do processo de progressão de melanomas.

### 5.3 MUTAÇÕES BRAF EM PARES DE TUMORES PRIMÁRIOS E METÁSTASES CORRESPONDENTES

Em 15 casos, tanto o tumor primário quanto sua metástase correspondente foram avaliados e a mutação BRAF foi encontrada em seis casos metastáticos. Considerando-se a frequência das mutações nas lesões primárias (39,5%) e metastáticas (40%), não houve significância estatística entre os dois grupos. Em relação a esses achados, as mutações BRAF parecem estar relacionadas mais com a iniciação do que com a progressão de melanomas.

Omholt et al. também caracterizaram as mutações BRAF como um evento inicial na progressão de melanoma primário. Esses autores detectaram que as mesmas mutações em melanomas em fase de crescimento vertical estavam também presentes em células correspondentes à sua fase de crescimento radial (OMHOLT,

2003). Esta é a mesma conclusão de Libra et al. que encontraram frequências similares de mutações BRAF em melanomas primários e metastáticos. Tanto lesões primárias como metastáticas apresentaram frequência de mutações de 40%, o que indica que elas provavelmente ocorram antes do desenvolvimento de doença metastática (LIBRA, 2005). As mutações V599E e V599K parecem representar eventos iniciais na transformação melanocítica, possivelmente contribuindo para sua proliferação e sobrevivência, mas não para sua disseminação metastática (DEICHMANN, 2005).

Em quatro casos, a lesão primária e sua metástase correspondente apresentaram o mesmo genótipo BRAF, ou seja, a mesma mutação presente nas lesões primárias foi preservada em suas metástases. Este achado é concordante com alguns autores que sugeriram que mutações BRAF ocorrem antes do melanoma metastatizar, pois mutações detectadas em melanomas metastáticos estavam usualmente presentes nas lesões primárias que os originaram (OMHOLT, 2003).

Em nossos casos, se o tumor primário era “wild-type” para o gene BRAF, nenhuma mutação surgiu no estágio metastático, com exceção de dois casos, onde a lesão metastática apresentou a mutação e a lesão primária não, o que sugere que esta ocorreu durante a progressão tumoral. Este número de casos é muito pequeno para ser interpretado de maneira significativa, mas Omholt et al. também encontraram em seu estudo a presença de mutações BRAF em lesões metastáticas de dois pacientes que não foram encontradas na lesão primária correspondente (OMHOLT, 2003). Outros investigadores já observaram que quando mutações BRAF estão presentes em melanomas metastáticos elas são frequentemente ausentes na lesão primária (SHINOZAKI, 2004). Uma interpretação para este fato é que as mutações estavam presentes na lesão primária destes pacientes, mas provavelmente em subclones menores, muito pequenos para serem detectadas pelos métodos utilizados.

Goydos et al. observaram uma diferença significativa na incidência de mutações V599E entre amostras de melanomas representando diferentes estágios de progressão do tumor. Lesões primárias, metástases dérmicas regionais e metástases à distância apresentaram maior frequência de mutações do que metástases linfonodais. Os autores observaram que metástases linfonodais apresentaram a incidência mais baixa de mutações V599E, ou seja, apenas 40%.

Frequentemente a metástase linfonodal não apresentou a mutação encontrada na lesão primária, na metástase regional ou na metástase à distância do mesmo paciente. Este achado foi interpretado considerando o tumor primário como um mosaico, contendo células “wild-type” e células mutantes e que ambas as células podem originar as metástases, o que explica o achado da mutação na lesão primária, mas não na metástase do mesmo paciente. Eles concluíram que mutações na cascata MAPK quinase podem não ser necessárias para que o melanoma metastatize para linfonodos de cadeias regionais (GOYDOS, 2005).

No apêndice 5 estão relacionados os principais estudos que pesquisaram mutações BRAF e os parâmetros investigados pelos diferentes autores em comparação com o presente estudo.

#### 5.4 CORRELAÇÃO DAS MUTAÇÕES BRAF COM PARÂMETROS CLÍNICOS

A maioria dos estudos não mostra correlação significativa entre mutações BRAF com parâmetros clínicos e histológicos, incluindo sexo, idade ao diagnóstico, estadió clínico ao diagnóstico, tipo histológico do melanoma, nível de invasão tumoral de acordo com Clark, espessura tumoral, presença de ulceração, local da primeira recorrência ou sobrevida geral ( OMHOLT, 2003; SHINOZAKI, 2004; THOMAS, 2004; LIBRA, 2005; SALDANHA, 2006).

No presente estudo foi observado que os espécimens de melanomas que apresentaram mutações BRAF pertenceram a pacientes mais jovens quando comparados àqueles onde mutações não foram identificadas. No estudo de Shinozaki et al. a idade foi o único fator prognóstico que apresentou correlação com a mutação BRAF na lesão primária. A frequência de mutação foi significativamente maior em pacientes < 60 anos de idade e foi maior em pacientes < 40 anos quando comparados com menos de 10% em pacientes  $\geq$  70 anos (SHINOZAKI, 2004). Goel et al. também observaram que mutações BRAF estavam significativamente associadas com pacientes mais jovens, assim como Viros et al., que identificaram idade < 55 anos como o único fator preditivo de mutação BRAF e Liu et al. que reportaram a ocorrência da mutação mais frequentemente entre pacientes com 50 anos de idade ou menos (GOEL, 2006; LIU, 2007; VIROS, 2008). Acredita-se que



melanomas em pacientes mais jovens seja causado por fatores genéticos ou intrínsecos e estudos recentes em melanomas familiares têm demonstrado que não há evidência de mutações no éxon 15 do gene BRAF em células germinativas, sendo assim improvável este seja um gene de susceptibilidade para melanoma (LANG, 2003). É difícil afirmar se a idade tem papel significativo na aquisição destas mutações. Estudos maiores serão necessários para validar esses resultados e provar se melanomas em pacientes mais jovens seriam biologicamente diferentes de melanomas em idosos.

Em contraste com estudos prévios que observaram uma tendência de maior incidência de mutações BRAF em pacientes do sexo feminino (SHINOZAKI, 2004) e uma possível associação da mutação com o sexo masculino (THOMAS, 2004), nossos dados não mostraram diferença estatística em relação ao sexo dos pacientes com proporções similares de mutação entre eles.

Em relação à localização da lesão, a maioria dos melanomas em pessoas de pele clara ocorre no tronco e extremidades e evidências epidemiológicas sugerem que exposição solar intermitente é o maior fator patogênico. Em contraste, melanomas que ocorrem em pele sujeita a dano solar crônico, como a face, tendem a ocorrer mais tardiamente e desenvolvem-se mais lentamente (LeBOIT, 2006). Entretanto, a relação entre melanoma cutâneo e exposição à radiação ultra-violeta (UV) é complexa e pouco entendida e não há relação clara entre dose e resposta (MALDONADO, 2003).

Utilizando o parâmetro que Maldonado et al. usaram em seu estudo, dividimos os melanomas em dois grupos: aqueles que ocorreram em pele sujeita à exposição solar intermitente ou pele raramente exposta, o que incluiu tronco, membros superiores, membros inferiores e acral) e aqueles que ocorreram em pele cronicamente exposta à luz solar como cabeça e pescoço (MALDONADO, 2003). Lang et al. também acessaram o dano solar de acordo com o local de origem da lesão, porém cabeça, pescoço e mãos em ambos os sexos e pernas no sexo feminino foram consideradas como áreas constantemente expostas e tronco e braços em ambos os sexos e pernas no sexo masculino foram definidas como áreas sujeitas à exposição solar intermitente (LANG, 2005). Deichmann et al. consideraram as lesões localizadas na cabeça, face ou região dorsal das mãos como cronicamente exposta à radiação UV (DEICHMANN, 2006). Saldanha et al. utilizaram diferentes critérios, avaliando a elastose solar no tecido adjacente: casos

apresentando áreas coalescentes de elastose solar na derme foram definidas como apresentando dano solar crônico, casos com áreas não coalescentes foram consideradas como apresentando dano UV não-crônico e aqueles sem elastose solar como dano UV mínimo (SALDANHA, 2006). A avaliação da exposição solar de acordo com a localização anatômica da lesão, como foi aqui utilizado, pode levar a pressupostos não confirmáveis sobre o grau de dano solar e é provavelmente um método menos confiável do que o acesso direto do dano solar, mas consideramos que a avaliação histológica da elastose solar também está sujeita a algum grau de subjetividade.

Quando comparamos os dois grupos observamos uma predominância significativa de mutações BRAF em lesões originadas em áreas sujeitas à exposição solar intermitente versus crônica ( $p < 0,001$ ). O mesmo foi relatado por outros estudos (MALDONADO, 2003; LANG, 2005; SALDANHA, 2006; DEICHMANN, 2006; POYNTER, 2007; LIU, 2007). Enquanto alguns autores especularam que a radiação UV pode induzir mutações BRAF, nossos achados parecem indicar que exposição solar crônica não aumenta a frequência destas mutações e que elas podem não estar de maneira alguma relacionadas à radiação UV. Neste contexto, deve se levar em consideração o fato de que mutações BRAF também são encontradas em outras neoplasias como carcinoma papilífero da tireóide, carcinoma colorretal, carcinoma pancreático e tumores ovarianos borderline, e que há outros fatores além de exposição à radiação UV que podem levar a essas mutações. Além disso, as transições CC → TT ou C → T que ocorrem no gene p53 em neoplasias cutâneas não melanocíticas e relacionadas à exposição solar não foram detectadas nos melanomas investigados. Saldanha et al. sugeriram que processos inflamatórios e danos oxidativos resultante da inflamação poderiam ser os fatores responsáveis pelas mutações BRAF em outros sítios não cutâneos, e que o dano UV poderia ser um dos diversos meios que originam uma resposta inflamatória. Outra possibilidade por trás destes padrões de mutação variáveis é que existam diferenças entre os melanócitos das diferentes regiões anatômicas, o que leva a variações sutis na expressão genética relacionadas ao ambiente local (SALDANHA, 2006).

Embora mutações BRAF em neoplasias melanocíticas não apresentem a “assinatura” característica das mutações induzidas pela radiação UV, é ainda possível que elas possam se originar da replicação errônea de DNA previamente

danificado pela radiação UV (THOMAS, 2006).

Deichmann et al. encontraram em seu estudo apenas duas transições C → T, que são frequentemente induzidas pela radiação UV. Essas mutações ocorreram em dois melanomas localizados na cabeça. Dentre 23 casos de melanomas cutâneos localizados em áreas submetidas à exposição solar crônica, um único tumor apresentou a mutação BRAF. De acordo com os autores, esses resultados são concordantes com dados epidemiológicos relacionados ao risco de melanoma que indicam que exposição solar intermitente e queimaduras solares de repetição na infância aumentam o risco de desenvolvimento desta neoplasia enquanto exposição solar crônica diminui o risco relativo (DEICHMANN, 2006).

## 5.5 CORRELAÇÃO DAS MUTAÇÕES BRAF COM PARÂMETROS HISTOLÓGICOS

Não houve diferença significativa entre o índice de Breslow nas lesões com ou sem mutações BRAF. Isso sugere que a incidência destas mutações não aumentam de acordo com maior espessura tumoral.

A falta de correlação entre mutações BRAF e o índice de Breslow sugere que não há relação destas mutações com instabilidades genéticas durante estágios precoces do crescimento desta neoplasia (SHINIOZAKI, 2004). Thomas et al. encontraram uma associação negativa limítrofe entre mutação BRAF e aumento da espessura tumoral (THOMAS, 2004) e a percentagem de melanomas com mutações BRAF diminuiu com o aumento da espessura das lesões no estudo de Liu et al. (LIU, 2007).

Não houve associação entre mutações BRAF com outros parâmetros histológicos utilizados para avaliação prognóstica como nível de Clark, número de mitoses, presença de ulceração, regressão e satelitose.

Apenas um dos artigos revisados menciona associação de mutações BRAF com taxa mitótica. Liu et al. observaram que tumores com poucas mitoses ( $<1/\text{mm}^2$ ) apresentaram uma maior percentagem de mutações do que aqueles com numerosas mitoses ( $\geq 10 \text{ mm}^2$ ) (LIU, 2007). Em nosso estudo, o ponto de corte do número de mitoses foi de 6 mitoses/  $\text{mm}^2$ , o mesmo utilizado por Barnhill et

al.(BARNHILL,2005), mas não houve correlação com a presença ou não de mutações.

## 5.6 CORRELAÇÃO DAS MUTAÇÕES BRAF COM SOBREVIDA CLÍNICA

Foi observado que as sobrevidas dos pacientes com ou sem mutações são semelhantes ( $p = 0,93$ ). Assim como estudos prévios (OMHOLT, 2003; MALDONADO, 2003; SHINOZAKI, 2004; DEICHMANN, 2004; DEICHMANN, 2005; VIROS, 2007) não encontramos associação significativa ou tendência entre mutações BRAF nos melanomas cutâneos primários com evolução clínica ou sobrevida livre de doença. A análise deste seguimento de curto prazo sugere que mutações BRAF não são um fator preditivo importante para a evolução da doença.

Shinozaki et al. sugeriu que mutações BRAF são alterações complementares que ocorrem em conjunto com outras aberrações genéticas frequentes em melanomas (SHINOZAKI, 2004). Kumar et al. encontraram em seu estudo sobre melanomas metastáticos uma associação de diminuição do tempo de resposta ao tratamento em pacientes com mutações BRAF, o que de acordo com os autores, indica o envolvimento da ativação BRAF além da iniciação desta a neoplasia. Eles também reportaram uma associação não significativa entre mutações BRAF e maior sobrevida livre de doença (KUMAR, 2003).

## 5.7 CORRELAÇÃO DAS MUTAÇÕES BRAF COM A PRESENÇA DE NEVO ASSOCIADO

Não houve associação do status mutacional com a presença de nevo melanocítico associado ao tumor, apesar de mutações BRAF já terem sido reportadas na grande maioria dos nevos, sugerindo que melanomas com essas mutações possam surgir de nevo pré-existente (POLLOCK, 2003), embora aparentemente eventos adicionais sejam necessários para a progressão para melanoma (LANG, 2005). Não há evidências de que a presença de mutações BRAF

em nevos facilite sua progressão para melanoma (SHINOZAKI; 2004). Poynter et al. reportaram que tumores com mutações BRAF ocorreram com maior frequência em associação com um nevo contíguo, embora a presença deste não foi observada em todos melanomas com mutações. Estes achados apóiam a evidência de que a casacata MAPK está ativada em uma larga percentagem de lesões melanocíticas, mas essas mutações não são suficientes para a transformação maligna (POYNTER, 2006).

O Apêndice 6 apresenta a comparação do presente estudo com os principais artigos da literatura atual, em relação à associação das mutações BRAF com parâmetros clínicos e histológicos avaliados.

## 5.8 MUTAÇÕES C-KIT

O c-Kit, gene essencial para sobrevivência e desenvolvimento de melanócitos, está sujeito a mutações oncogênicas em diversos tipos de neoplasias e apesar de ele ser normalmente expresso por melanócitos, mutações c-Kit não são encontradas frequentemente em melanomas, como foi comprovado pelo presente estudo, onde a avaliação de 96 melanomas cutâneos primários e 15 metastases não identificou a mutação L576P, a mais frequentemente descrita nesta neoplasia. Esses resultados estão parcialmente de acordo com a literatura que mostra a baixa frequência desta mutação em melanomas (WILLMORE-PAYNE, 2005; WILLMORE-PAYNE, 2006).

De acordo com alguns autores, presença de mutação c-Kit em melanomas metastáticos sugere que um pequeno número de melanomas podem progredir através da mutação somática deste gene (WILLMORE-PAYNE, 2005), o que não podemos afirmar em nosso estudo.

A proteína c-Kit é expressa normalmente nas células intersticiais de Cajal, células germinativas, mastócitos e melanócitos e a ativação do c-Kit por mutações é encontrada em neoplasias derivadas de células dessas linhagens, como os GISTs, seminomas e mastocitomas. De acordo com alguns autores a baixa frequência de mutações deste gene em melanomas seria explicado pelo fato de que o mecanismo de tumorigênese em melanomas envolvendo o c-Kit é fundamentalmente diferente daquele envolvido em outras neoplasias e que a falta de expressão do c-Kit não

exclui uma mutação precoce com subsequente “downregulation” de sua expressão (WILLMORE-PAYNE, 2005).

A falta da expressão do c-Kit não exclui uma mutação inicial em melanomas e apesar da baixa frequência de mutações nesta neoplasia, pode existir uma pequena proporção de pacientes que poderia se beneficiar da terapia com imatinib (WILLMORE-PAYNE, 2006)

Os resultados de nosso estudo difere de Curtin et al., que reportaram uma frequência aproximada de 34% de mutações e/ou aumento de cópias do c-Kit. Uma possível explicação para a diferença entre esses estudos seria o fato de que esses autores pesquisaram mutações nos éxons 11,13, 17 e 18 deste gene, enquanto no presente estudo apenas o éxon 11 foi acessado.

Existem discrepâncias também entre Curtin et al. e Willmore-Payne et al. De acordo com Curtin et al., esses resultados são contrastantes porque nos estudos prévios de Willmore-Payne foram utilizadas linhagens de células de melanoma para análise, que são derivadas usualmente de subtipos de melanomas que ocorrem em pele com exposição solar intermitente e que frequentemente apresentam mutações BRAF (WILLMORE-PAYNE, 2005; CURTIN, 2006). Foram encontrados na literatura apenas três estudos, sendo dois do mesmo grupo de pesquisadores, que analisaram concomitantemente mutações BRAF e c-kit (WILLMORE-PAYNE, 2005; WILLMORE-PAYNE, 2006; CURTIN, 2006). A maioria deles reportam a expressão imunohistoquímica do c-Kit em melanomas, poucos realizaram análise molecular deste gene nesta neoplasia, e dentre esses, nenhum correlacionou seus resultados com fatores prognósticos clínicos ou histológicos dos melanomas cutâneos. O objetivo deste estudo era correlacionar esses fatores, assim como foi feito com as mutações BRAF, mas a ausência de mutações c-Kit em nossas amostras não permitiu tal avaliação.

## 6 CONCLUSÃO

Após a análise da expressão dos genes BRAF e c-Kit e sua correlação com fatores prognósticos em uma população de pacientes portadores de melanoma cutâneo, os resultados obtidos permitem concluir que:

1. Devido a uma frequência relativamente baixa de mutações BRAF encontradas em melanomas cutâneos primários e metastáticos, tais alterações genéticas não são determinantes fundamentais da carcinogênese desta neoplasia.
2. A mutação BRAF mais frequente é a substituição da valina por ácido glutâmico na posição V599E do éxon 15 do gene BRAF.
3. Pela sua ausência em pele normal, as mutações BRAF devem ser consideradas mutações somáticas adquiridas.
4. As mutações BRAF são encontradas em melanomas finos e grossos e não influenciam na transição de um tipo de lesão para o outro.
5. A presença de mutações BRAF em melanomas cutâneos não tem papel na progressão tumoral, especificamente no desenvolvimento de doença metastática.
6. Pessoas jovens portadoras de melanomas cutâneos têm maior probabilidade de apresentar mutações BRAF do que as portadoras idosas.
7. Melanomas cutâneos originários de áreas de pele sujeitas à exposição solar intermitente apresentam mutações BRAF com maior frequência do que as originárias de áreas de pele sujeita à exposição solar crônica.
8. Não há correlação estatística entre a presença de mutações BRAF e os parâmetros clínicos sexo, idade e sobrevida, assim como os parâmetros histológicos índice de Breslow, nível de Clark, número de mitoses, presença de ulceração, regressão ou satelitose.
9. A ausência de mutações L576P (c-Kit) nos melanomas primários, nas lesões metastáticas e na pele normal da presente série impediu as conclusões referentes a correlação deste gene com os fatores prognósticos estudados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, A. B. Malignant melanoma: a unifying concept. **Am. J Dermatopathol.**, v. 2, n.4, p. 309-313, 1980.

ALEXEEV, V.; YOON, K. Distinctive Role of the cKit receptor Tyrosine Kinase Signaling in Mammalian Melanocytes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 126, p. 1102-1110, 2006.

AMERICAN CANCER SOCIETY (Atlanta, EUA). Cancer facts and figures 2009. Disponível em: <http://www.cancer.org/downloads/STT/500809web.pdf>. Acesso em 10 jul. 2010.

BALCH,C.M.; BUZAID, A.C.; SOONG, S.J.; ATKINS, M.B.; CASCINELLI,N.; COIT, D.G.; FLEMING, I.D.; GERSHENWALD, J.E.; HOUGHTON, A.; KIRKWOOD, J.M. ; MCMASTERS, K.M.; MIHN, M.F.; MORTON, D.L.; REINTGEN, D.S.; ROSS, M.I.; SOBER, A. THOMPSON, J.A.; THOMPSON, J.F. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma.**J. Clin. Oncol.**,n.19,p.3635-3648, 2001.

BALCH, C.M.; SOONG, S.J.; ATKINS,M.B.; BUZAID, A.C.; CASCINELLI, N.; COIT, D.G.; FLEMING, I.D.; GERSHENWALD, J.E.; HOUGHTON, A.; KIRKWOOD, J.M.; McMASTERS, K.M.; MIHM, M.F.; MORTON, D.L.; REINTGEN, D.S.; ROSS, M.I.; SOBER, A.; THOMPSON, J.A.; THOMPSON, J.F. An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. **Cancer J. Clin.**, n.54, p.131-149, 2004.

BARNHILL, R.L.; KATZEN, J.; SPATZ, A.; FINE, J.; BERWICK, M. The importance of mitotic rate as a prognostic factor for localized cutaneous melanoma. **J. Cutan. Pathol.**, v.32, n.4,p.268-273,2005.

CHIN, L.; GARRAWAY,L.A.; FISHER, D.E. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. **Genes & Development**, n.20, p. 2149-2182, 2008.

CURTIN, J.A.; BUSAM,K.; PINKEL, D.; BASTIAN, B. Somatic Activation of KIT in Distinct Subtypes of Melanoma. **J. Clin. Oncol.**, v.24, n. 26, p. 4340-4346, 2006.

DAVIES, H.; BIGNELL, G.R. ;COX, C.;STEPHENS, P.; EDKINNS, S.; CLEGE, S.; TEAGUE, J.; WOFFENDIN, H.; GARNETT, M.J.; BOTTOMLEV, W.; DAVIS, N.; DICKS, E.; EWING, R.; FLOYD, Y.; GRAY, K.; HALL, S.; HAWES, R.; HUGHE, J.; KOSMIDOU, V.; MENZIES,A.; MOULD, C.; PARKER, A.; STEVENS, C.; WATT, S.; HOOPER, S.; WILSON, R.; JAVYATILAKE, H.; GUSTERSON, B.A.; COOPER, C.; SHIPLEY, J.; HARGRAVE, D.; PRITCHARD-JONES, K.; MAITLAND, N.; CHENEVIX,-TRENCH, G.; RIGGINS, G.J.; BIGNER, D.D.; PALMIERI, G.; COSSU, A.; FLANAGAN, A.; NICHOLSON, A.; HO, J.W.; LEUNG, S.Y.; YUEN, S.T.; WEBER, B.L.; SEIGLER, H.F.; DARROW, T.L.; PATERSON, H.; MARAIS, R.; MARSHALL, C.J.; WOOSTER, R.; STRATTON, M.R.; FUTREAL, P.A. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, n.417, p.949-954, 2002.



DEICHMANN, M.; THOME, M.; BENNER, A.; NÄHER, H. B-raf Exon 15 Mutations Are Common in Primary Melanoma Resection Specimens but Not Associated with Clinical Outcome. **Oncology**, n.66, p.411-419, 2004.

DEICHMANN, M.; THOME, M.; BENNER, A.; KIRSCHNER, M.; HASSANZADEH, J.; KURZEN, H. Preponderance of the oncogenic V599E and V599K mutations in B-raf kinase domain is enhanced in melanoma cutaneous/subcutaneous metastases. **BMC Cancer** 5: 58, 2005

DEICHMANN, M.; KRAHL, D.; THOME, M.; WÜST, K.; HASSANZADEH, J.; HELMKE, B. The oncogenic B-raf V599E mutation occurs more frequently in melanomas at sun-protected body sites. **Intern. J. Oncol.**, n.29, p. 139-145, 2006.

DONG, J.; PHELPS, R.G.; QIAO, R.; et al. BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. **Cancer Res.**, n.63, p.3883-3885, 2003.

FIGUEIREDO, L.C.; CORDEIRO, L.N.; ARRUDA, A.P.; et al. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.49, n.3, p.179-183, 2003.

FRANCKEN, A.B.; SHAW, H.M.; THOMPSON, J.F.; et al. The prognostic importance of tumor mitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous melanoma and long follow-up. **Ann. Surg. Oncol.**, n.11, p.426-433, 2004.

FUNASAKA, Y.; BOULTON, T.; COBB, M.; YARDEN, Y.; FAN, B.; LYMAN, S.D.; WILLIAMS, D.E.; ANDERSON, D.M.; ZAKUT, R.; MISHIMA, Y.; HALABAN, R. C-Kit-Kinase induces a cascade of protein tyrosine phosphorylation in normal human melanocytes in response to mast cell growth factor and stimulates mitogen-activated protein kinase but is down-regulated in melanomas. **Molecular Biol. Cell**, v.3, p.197-209, 1992.

GOEL, V.K.; LAZAR, A.J.F.; WARNEKE, C.L.; REDSTON, M.S.; HALUSKA, F.G. Examination of Mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in Primary Cutaneous Melanoma. **J. Invest. Dermatol.**, v.126, p. 154-160, 2006.

GOYDOS, J.S.; MANN, B.; KIM, H.J.; GABRIEL, E.M.; ALSINA, J.; GERMINO, F.J.; SHIH, W.; GORSKI, D.H. Detection of B-RAF and N-RAS mutations in Human melanoma. **J. Am. Coll. Surg.**, v.200, n.3, p.362-370, 2005.

HALUSKA, F.; PEMBERTON, T.; IBRAHIM, N.; KALINSKY, K. The RTK/RAS/BRAF/PI3K pathways in melanoma: biology, small molecule inhibitors, and potential applications. **Semin. Oncol.** v.34, n.6, p. 546-554, 2007.

HOMSI, J.; KASHANI-SABET, M.; JANE, L. Cutaneous Melanoma: Prognostic Factors. **Cancer Control**, San Francisco, v.12, n.4, p.223-229, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). **Câncer de pele: Melanoma**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008> Acesso em: 10 set. 2010.

JUNG, J.E.; FALK, T.M.; BRESCH, M.; MATIAS, J.E.F.; BÖER, A. BRAF Mutations in Cutaneous Melanoma in Brazilian Patients: No Correlation with Histological Prognostic Factors or Overall Survival. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, 2010. No prelo.

KIRSCHNER, M.; HELME, B.; STARZ, H.; BENNER, A.; THOME, M.; DEICHMANN, M. Preponderance of the oncogenic V599E and V599K mutations in the B-raf kinase domain is enhanced in melanoma lymph node metastases. **Melanoma Res.**, v. 15, n.5, p.427-434, 2005.

KUMAR, R.; ANGELINI, S.; CZENE, K.; SAUROJA, I.; HAHKA-KEMPPINEN, S.P.; HEMMINKI, K. BRAF Mutations in Metastatic Melanoma: A Possible Association with Clinical Outcome. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, p.3362-3368, 2003.

LANG, J.; MACKIE, R.M. Prevalence of Exon 15 BRAF Mutations in Primary Melanoma of the Superficial Spreading, Nodular, Acral, and Lentigo Maligna Subtypes. **J. Invest. Dermatol.**, n.125, p.575-579, 2005.

LeBOIT, F.E.; BURG, G.; WEEDON, D.; SARASIN, A. (Ed.). **World health organization classifications of tumors: Pathology and genetics of skin tumors.** Lyon: IARC Press, 2006.

LIBRA, M.; MALAPONTE, G.; NAVOLANIC, P.M.; et al. Analysis of BRAF mutation in primary and metastatic melanoma. **Cell Cycle**, v.4, n.10, p.1382-1384, 2005.

LIU, W.; KELLY, J.W.; TRIVETT, M.; MURRAY, W.K.; DOWLING, J.P.; WOLFE, R.; MASON, G.; MAGEE, J.; ANGEL, C.; DOBROVIC, A.; McARTHUR. Distinct Clinical and Pathological Features Are Associated with the BRAF<sup>T1799A(V600E)</sup> Mutation in Primary Melanoma. **J. Invest. Dermatol.**, v.127, p. 900-908, 2007.

MALDONADO, J.L.; FRIDLAND, J.; PATEL, H.; JAIN, A.N.; BUSAM, K.; KAGESHITA, T.; ONO, T.; ALBERTSON, D.G.; PINKEL, D.; BASTIAN, B.C. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. **J. National Cancer Institute**, v.95, n.24, p.1878-1880, 2003.

MASSI, G.; LeBOIT, P.E. **Histological Diagnosis of Nevi And Melanoma**, Springer, 2004.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> . Acesso em 06. dez.2008.

NETO, D.S.; PANTALEÃO, L.; SÁ, B.C.S.; LANDMAN, G. Alpha-v-beta3 integrin expression in melanocytic nevi and cutaneous melanoma. **J. Cutan. Pathol.**, v.34, n.11, p.851-856, 2007

OMHOLT, K.; PLATZ, A.; KANTER, L.; RINGBORG, U.; HANSSON, J. NRAS and BRAF Mutations arise Early during Melanoma Pathogenesis and are Preserved throughout Tumor Progression. **Clin. Cancer Res.**, v.9, n.15 p.6483-6488, 2003.

POLLOCK, P.M.; HARPER, U.L.; HANSEN, K.S.; YUDT, L.M.; STARK, M.; ROBBINS, C.M.; MOSES, T.Y.; HOSTETTER, G.; WAGNER, U.; KAKAREKA, J.; SALEM, G.; POHIDA, T.; HEENAN, P.; DURAY, P.; KALLIONIEMI, O.; HAYWARD,

N.K.; TRENT, J.M.; MELTZER, P.S. High frequency of BRAF mutations in nevi. **Nat. Genet.**, v. 33, n. 1, p. 19-20, 2003

POYNTER, J.N.; ELDER, J.T.; NAIR, R.P.; SOENGAS, M.S.; JOHNSON, T.M.; REDMAN, B.; THOMAS, N.E.; GRUBER, S.B. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. **Melanoma Res.**, v. 16, n.4, p. 267-273, 2006.

RICANIADIS, N.; KATAKI, A.; AGNANTIS, N.; ANDROULAKIS, G. ; KARAKOUSIS, C.P. Long –term prognostic significance of HSP-70, c-myc and HLA-DR expression in patients with malignant melanoma. **Eur. J. Surg. Oncol.**, v.1, n.27, p.88-93, 2001.

RUITER,D.; VAN MUIJEN, G. P. Markers of melanocytic tumor progression, **Journal of Pathology**, n.186,p.340-342,1998.

SALDANHA, G.; POTTER, L.; DaFORNO, P.; PRINGLE,J.H. Cutaneous Melanoma Subtypes show Different BRAF ans NRAS Mutation Frequencies. **Hum. Cancer Biol.** v.12, n.15, p. 4499-4505, 2006

SASAKI, Y.; NIU, C.; MAKINO, R.; KUDO, C.; SUN, C.; WATANABE, H.; MATSUNAGA,J.; TAKAHASHI,K.; TAGAMI,H.; AIBA,S.; HORII,A. BRAF Point Mutations in Primary Melanoma show Different Prevalences by Subtype. **J. Invest. Dermatol.** n.123, p. 177-183, 2004.

SHINOZAKI , M.; FUJIMOTO, A.; MORTON, D.L.; HOON,D.S.B. Incidence of BRAF oncogene mutation and Clinical Relevance for Primary cutaneous melanoma. **Clin. Cancer Research.** v.10, p.1753-1757,2004.

SMYTH, P.; FINN, S.; CAHILL, S.; O'REAGAN, E.; FLAVIN, R.; O'LEARY,J.J.; SHEILS,O. ret/PTC and BRAF act as distinct molecular, time-dependant triggers in a sporadic Irish cohort of papillary thyroid carcinoma. **Int. J. Surg. Pathol.** v. 13, n. 1, p.1-8, 2005.

THOMAS, N.E.; ALEXANDER, A.; EDMISTON, S.N.; PARRISH, E. ; MILLIKAN, R.C. ; BERWICK, M. ; GROBEN, P. ; OLLILA, D.W. ; MATTINGLY, D. ; CONWAY, K. Tandem BRAF mutations in primary invasive melanomas. **J. Invest.Dermatol.**, n.122, p.1245-1250, 2004.

THOMAS, N.E.; BERWICK, M.; CORDEIRO-STONE, M. Could BRAF Mutations in Melanocytic Lesions Arise from DNA Damage Induced by Ultraviolet Radiation? **J. Invest. Dermatol.**, v. 126, p. 1693-1696, 2006.

URIBE, P.; WISTUBA, I.I.; GONZÁLEZ, S. BRAF mutation: a frequent event in benign, atypical and malignant melanocytic lesions of the skin. **Am. J. Dermatopathol.**, v.25, n.5, p.365-370, 2003.

VIROS, A.; FRIDLAND, J.; BAUER, J.; LASITHIOTAKIS,K.; GARBE, C.; PINKEL, D.; BASTIAN, B.C. Improving Melanoma Classification by Integrating Genetic and Morphologic Features. **PloS Medicine**, v. 5, n.6, e120, 2008.

WEINLICH, G.; BITTERLICH, V.; FRITSCH, P.O.; ZELGER, B. Metallothionein overexpression as a prognostic factor for progression and survival in melanoma. A prospective study on 520 patients. **British J. Dermatol.**, v.149, n.3, p.535-541, 2003.

WENT, P.T.; DIMHOFER, S.; BUNDI, M.; MIRLACHER, M.; SCHRAML, P.; MANGIOLAIO, S. DIMITRIJEVIC, S.; KONONEN, J.; LUGLI, A.; SIMON, R.; SAUTER, G. Prevalence of KIT expression in human tumors. **J. Clin. Oncol.**, n. 22, p. 4514-4522, 2004.

WILLMORE-PAYNE, C.; HOLDEN, J.A.; TRIPP, S.; LAYFIELD, L. Human malignant melanoma: detection of BRAF and c-Kit- activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. **Hum. Pathol.**, n.36, p. 486-493, 2005.

WILLMORE-PAYNE, C.; HOLDEN, J.A.; HIRSCHOWITZ, S.; LESTER, J.L. BRAF and c-Kit gene copy number in mutation-positive malignant melanoma. **Hum. Pathol.**, n. 37, p. 520-527, 2006.

WINNENPENNINCKX, V.; LAZAR,V.; MICHIELS, S.; DESSEN, P.; STAS, M.; ALONSO, S.R.; Avril, M.; ROMERO, P.L.O.; ROBERT, T.; BALACESCU. O.; EGGERMONT, A.M.M.; LENOIR, G.; SARASIN, A.; TURSZ, T.; OORD, J.J.; SPATZ, A. Gene Expression Profiling of Primary Cutaneous Melanoma and Clinical Outcome. **J. Nat. Cancer Instit.**, v.98, n.7, p. 472-482, 2006.

## APÊNDICES

APÊNDICE 1 - RELAÇÃO DOS CASOS ONDE FOI REALIZADO O SEQUENCIAMENTO DIRETO DOS PRODUTOS DE PCR DO ÉXON 15 DO GENE BRAF.....	65
APÊNDICE 2 - RELAÇÃO DOS CASOS ONDE FOI REALIZADO O SEQUENCIAMENTO DIRETO DOS PRODUTOS DE PCR DO GENE C-KIT.....	66
APÊNDICE 3 - VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS E MUTAÇÃO BRAF DOS MELANOMAS FINOS.....	67
APÊNDICE 4 - VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS DA MUTAÇÃO BRAF NOS MELANOMAS GROSSOS.....	68
APÊNDICE 5 - RELAÇÃO DE ESTUDOS DA MUTAÇÃO BRAF EM MELANOMAS CUTÂNEOS E OS PARÂMETROS INVESTIGADOS.....	71
APÊNDICE 6 - COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS NOS ESTUDOS DA MUTAÇÃO BRAF EM MELANOMAS CUTÂNEOS.....	74

APÊNDICE 1- RELAÇÃO DOS CASOS ONDE FOI REALIZADO O SEQUENCIAMENTO DIRETO DOS PRODUTOS DE PCR DO ÉXON 15 DO GENE BRAF

CASO	EXAME	ESTADO MUTACIONAL DO GENE BRAF
<b>MELANOMAS FINOS</b>		
8	16207	WT
12	21086	WT
<b>MELANOMAS GROSSOS</b>		
2	1399	WT
2 (pele normal)		WT
4	2909	T1796A(V599E)
6	3555	T1796A(V599E)
7	4127	T1796A(V599E)
14 (pele normal)	11914	WT
16	13035	T1796A(V599E)
16 (pele normal)		WT
18	14111	WT
23	17190	WT
23 (metástase)	31101	WT
24	22922	WT
24 (pele normal)		WT
26	24007	WT
27	25422	GT1795AA (V599K)
27 (pele normal)		WT
29 (pele normal)	26847	WT
30	27291	T1796A(V599E)
33	3147	WT
39	34211	T1796A(V599E)
41	35420	WT
45	35918	GT1795AA (V599K)
51	41339	WT
58	44498	GT1795AA (V599K)
59	44910	WT
63	46605	WT
66	47169	WT
67	47397	WT
68	5363	WT
69	5991	WT

APÊNDICE 2 - RELAÇÃO DOS CASOS ONDE FOI REALIZADO O SEQUENCIAMENTO DIRETO DOS PRODUTOS DE PCR DO GENE C-KIT

CASO	EXAME	ESTATO MUTACIONAL DO GENE C-KIT
<b>MELANOMAS FINOS</b>		
6 fino	15535	WT
<b>MELANOMAS GROSSOS</b>		
6	3555	WT
7	4127	WT
12	11498	WT
16	13035	WT
16 (pele normal)		WT
22	16742	WT
23	17190	WT
24	22922	WT
24 (pele normal)		WT
27	25422	WT
27 (pele normal)		WT
51	41339	WT
57	44263	WT
67	47397	WT
67 (pele normal)		WT

APÊNDICE 3 - VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS E MUTAÇÃO BRAF DOS MELANOMAS FINOS

CASO	SEXO	IDADE	BRESLOW	CLARK	MITOSSES	LOCAL	REGRESSÃO	PROGNÓSTICO	SEGUIMENTO (anos)	BRAF MUT Primário	BRAF MUT Metástase
1	masculino	18	0,7	II	2	tronco	ausente	favorável	6	presente	
2	masculino	75	0,5	II	1	cabeça	presente	favorável	5	ausente	
3	feminino	40	0,3	II	1	tronco	ausente	favorável	5	presente	
4	masculino	30	0,6	II	0	tronco	presente	favorável	5	presente	
5	feminino	49	0,5	II	1	cabeça	ausente	favorável	5	ausente	
6	feminino	62	0,4	II	1	membro sup	presente	favorável	5	ausente	
7	feminino	46	0,9	II	1	cabeça	presente	favorável	5	presente	
8	feminino	65	0,9	II	2	tronco	ausente	favorável	5	ausente	
9	feminino	82	0,6	II	1	cabeça	presente	favorável	5	NA	
10	feminino	44	0,2	III	1	tronco	ausente	favorável	5	ausente	
11	feminino	58	0,4	II	5	membro inf	ausente	favorável	4	NA	
12	feminino	50	0,4	II	1	tronco	ausente	favorável	4	ausente	
13	masculino	49	0,6	II	0	membro inf	ausente	favorável	4	presente	
14	feminino	56	0,8	II	3	acral	ausente	favorável	4	ausente	
15	feminino	57	1	IV	1	membro sup	presente	desfavorável	2	presente	presente
16	masculino	24	0,8	II	1	tronco	presente	favorável	3	ausente	
17	feminino	46	0,5	II	0	membro sup	presente	favorável	3	ausente	
18	masculino	28	0,3	II	1	tronco	presente	favorável	3	presente	
19	feminino	38	0,5	II	2	tronco	ausente	favorável	3	presente	
20	masculino	67	0,4	II	0	membro inf	presente	favorável	3	ausente	
21	masculino	83	0,3	II	1	tronco	presente	favorável	3	presente	
22	masculino	36	0,9	II	2	tronco	ausente	favorável	2	presente	
23	feminino	57	0,8	II	1	Membro inf	presente	favorável	2	presente	
24	feminino	41	0,5	II	1	membro sup	ausente	favorável	2	presente	
25	feminino	38	0,6	II	0	membro inf	ausente	desfavorável	2	presente	ausente
26	masculino	52	0,9	II	1	tronco	ausente	favorável	2	ausente	
27	feminino	29	0,5	II	1	cabeça	presente	favorável	2	ausente	



APÊNDICE 4 - VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS DA MUTAÇÃO BRAF NOS MELANOMAS GROSSOS

CASO	SEXO	IDADE	LOCAL	BRESLOW	CLARK	MITOSES	ULCERAÇÃO	REGRESSÃO	SATELITOSE	PROGNÓSTICO	SEGUIMENTO (anos)	BRAF MUT Primário	BRAF MUT Metástase
1	masculino	73	acral	2	II	2	ausente	ausente	ausente	desfavorável	6	ausente	
2	masculino	67	pescoço	8	IV	5	presente	presente	ausente	favorável	6	ausente	
3	feminino	55	acral	4,2	V	3	presente	presente	ausente	desfavorável	6	ausente	
4	masculino	65	tronco	1,3	II	3	ausente	presente	ausente	favorável	6	presente	
5	feminino	70	membro sup	3	IV	5	presente	ausente	ausente	desfavorável	2	presente	
6	feminino	32	tronco	1,3	II	2	presente	ausente	ausente	favorável	6	presente	
7	masculino	67	tronco	12	IV	7	presente	presente	ausente	favorável	1	presente	
8	feminino	43	tronco	1,1	III	2	presente	presente	ausente	favorável	6	ausente	
9	masculino	33	acral	8	IV	6	presente	ausente	ausente	desfavorável	6	NA	
10	feminino	78	tronco	6	III	3	presente	ausente	ausente	favorável	3	ausente	
11	feminino	40	tronco	1,92	II	2	ausente	ausente	ausente	favorável	5	ausente	
12	feminino	35	membro inf	1,5	II	2	presente	presente	ausente	desfavorável	5	presente	presente
13	masculino	42	tronco	4,4	III	8	presente	presente	ausente	desfavorável	3	presente	ausente
14	feminino	51	tronco	8,7	V	8	presente	ausente	ausente	favorável	5	presente	
15	masculino	34	membro sup	2,4	II	2	ausente	ausente	ausente	favorável	5	presente	
16	feminino	46	membro inf	2,6	III	3	presente	ausente	ausente	desfavorável	1	presente	presente
17	feminino	82	cabeça	9,6	III	6	presente	ausente	ausente	favorável	2	ausente	
18	masculino	71	pescoço	7	III	4	presente	ausente	presente	desfavorável	5	ausente	
19	feminino	17	acral	1,3	III	1	presente	presente	ausente	favorável	5	presente	
20	masculino	43	tronco	11,5	III	6	presente	ausente	ausente	desfavorável	1	presente	
21	feminino	46	tronco	1,1	II	2	ausente	presente	ausente	favorável	5	presente	
22	masculino	81	acral	5,1	V	3	presente	ausente	presente	favorável	5	ausente	
23	masculino	49	tronco	5	III	15	presente	presente	ausente	desfavorável	2	ausente	ausente
24	feminino	63	membro sup	5	IV	15	ausente	presente	ausente	favorável	4	ausente	

continua

APÊNDICE 4 - VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS MUTAÇÃO BRAF NOS MELANOMAS GROSSOS

CASO	SEXO	IDADE	LOCAL	BRESLOW	CLARK	MITOSES	ULCERAÇÃO	REGRESSÃO	SATELITOSE	PROGNÓSTICO	SEGUIMENTO (anos)	BRAF MUT Primário	BRAF MUT Metástase
25	masculino	80	acral	6,4	V	3	presente	ausente	presente	desfavorável	1	ausente	continua
26	masculino	64	tronco	2,2	III	1	ausente	presente	ausente	favorável	4	ausente	
27	feminino	77	cabeça	4,6	III	3	presente	ausente	ausente	desfavorável	3	presente	
28	masculino	72	acral	14	V	5	ausente	ausente	presente	desfavorável	4	ausente	
29	masculino	43	tronco	3,2	IV	1	presente	ausente	ausente	desfavorável	4	ausente	
30	feminino	29	tronco	2,8	III	7	presente	ausente	ausente	favorável	0,8	presente	
31	feminino	41	tronco	1,5	II	8	ausente	ausente	ausente	favorável	4	presente	
32	masculino	53	acral	11,5	V	15	presente	ausente	ausente	desfavorável	1	ausente	ausente
33	feminino	52	tronco	3	III	4	presente	presente	ausente	favorável	3	ausente	
34	masculino	73	acral	8	IV	6	presente	ausente	presente	favorável	3	ausente	
35	masculino	81	cabeça	1,2	III	2	ausente	presente	ausente	favorável	3	ausente	
36	masculino	46	membro sup	1,3	III	2	ausente	ausente	ausente	favorável	3	ausente	
37	masculino	83	acral	12	IV	3	presente	ausente	presente	favorável	3	ausente	
38	feminino	83	acral	1,1	II	3	presente	ausente	ausente	desfavorável	3	NA	
39	masculino	23	acral	6	IV	11	presente	ausente	ausente	desfavorável	1	presente	
40	feminino	35	acral	2,7	III	3	ausente	ausente	ausente	desfavorável	3	ausente	ausente
41	masculino	72	acral	6,3	IV	7	presente	ausente	ausente	desfavorável	3	ausente	ausente
42	masculino	60	membro inf	15	V	1	presente	ausente	ausente	desfavorável	3	ausente	
43	feminino	39	tronco	1,9	III	3	presente	ausente	ausente	favorável	3	presente	
44	masculino	54	membro inf	1,3	II	2	ausente	presente	ausente	favorável	3	ausente	
45	masculino	42	tronco	7	IV	2	presente	ausente	presente	favorável	2	presente	
46	masculino	33	tronco	1,2	II	1	ausente	presente	ausente	favorável	3	presente	
47	masculino	78	acral	5	IV	2	presente	ausente	ausente	favorável	3	ausente	
48	masculino	25	cabeça	7	II	6	presente	presente	ausente	favorável	3	presente	

continuação

APÊNDICE 4 - VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS DA MUTAÇÃO BRAF NOS MELANOMAS GROSSOS

CASO	SEXO	IDADE	LOCAL	BRESLOW	CLARK	MITOSES	ULCERAÇÃO	REGRESSÃO	SATELITOSE	PROGNÓSTICO	SEGUIMENTO (anos)	BRAF MUT Primário	BRAF MUT Metástase
49	masculino	62	membro sup	2,5	IV	1	presente	presente	ausente	favorável	3	ausente	
50	masculino	78	tronco	2	III	2	ausente	presente	ausente	favorável	2	presente	
51	masculino	50	tronco	6	IV	4	ausente	presente	ausente	favorável	2	ausente	
52	feminino	49	tronco	3,5	III	3	ausente	presente	ausente	desfavorável	1	presente	continuação
53	masculino	62	tronco	4,5	III	6	presente	presente	ausente	desfavorável	2	presente	
54	feminino	40	acral	4,2	V	5	ausente	presente	presente	desfavorável	2	ausente	ausente
55	masculino	64	cabeça	8	IV	3	ausente	ausente	presente	favorável	2	ausente	
56	feminino	52	acral	4,6	IV	2	presente	ausente	ausente	desfavorável	2	presente	NA
57	feminino	35	tronco	1,6	III	3	ausente	presente	ausente	desfavorável	2	ausente	presente
58	masculino	56	cabeça	8	IV	3	presente	ausente	presente	desfavorável	2	presente	
59	masculino	75	cabeça	2,5	III	3	presente	ausente	ausente	favorável	2	ausente	
60	feminino	37	acral	10,8	V	1	presente	ausente	ausente	favorável	2	ausente	
61	feminino	76	acral	9,8	V	8	presente	ausente	ausente	desfavorável	2	ausente	presente
62	masculino	28	tronco	13	V	3	presente	ausente	ausente	desfavorável	2	presente	presente
63	masculino	48	pescoço	5	III	10	presente	presente	ausente	favorável	0,9	ausente	
64	masculino	55	acral	1,8	II	3	ausente	presente	ausente	favorável	2	ausente	
65	feminino	75	cabeça	1,1	II	1	ausente	presente	ausente	favorável	2	ausente	
66	feminino	58	membro inf	3	IV	3	presente	ausente	ausente	favorável	2	ausente	
67	feminino	28	membro sup	5,5	IV	1	presente	ausente	presente	desfavorável	2	ausente	NA
68	feminino	46	tronco	1,2	II	1	ausente	presente	ausente	favorável	1	ausente	
69	feminino	45	tronco	1,1	II	1	ausente	presente	ausente	favorável	1	ausente	

MUT: mutação, inf: inferior, sup:superior, NA: não avaliável

APÊNDICE 5 - RELAÇÃO DE ESTUDOS DA MUTAÇÃO BRAF EM MELANOMAS CUTÂNEOS E OS PARÂMETROS INVESTIGADOS

Número de lesões primárias estudadas	Número de lesões primárias com mutações BRAF (%)	Associação com iniciação da lesão	Número de lesões metastáticas estudadas	Número de lesões metastáticas com mutações BRAF (%)	Associação com progressão tumoral ou desenvolvimento de metástases	Referências
9	6 (67%)	-	-	-	-	Davies et al. (2002)
28	7 (25%)	não	13	8 (61,5%)	sim	Dong et al. (2003)
71	42 (59%)	sim	88	43 (49%)	sim (presente durante progressão tumoral)	Omholt et al. (2003)
115	32 (28%)	-	-	-	-	Maldonado et al. (2003)
-	-	-	38	26 (68%)	-	Kumar et al. (2003)
59	18 (31%)	não	68	39 (57%)	sim	Shinozaki et al. (2004)
35	9 (26%)	sim	-	-	-	Sasaki et al. (2004)
37	17 (46%)	sim	-	-	não	Thomas et al. (2004)

continua

APÊNDICE 5 - RELAÇÃO DE ESTUDOS DA MUTAÇÃO BRAF EM MELANOMAS CUTÂNEOS E OS PARÂMETROS INVESTIGADOS

Número de lesões primárias estudadas	Número de lesões primárias com mutações BRAF (%)	Associação com iniciação da lesão	Número de lesões metastáticas estudadas	Número de lesões metastáticas com mutações BRAF (%)	Associação com progressão tumoral ou desenvolvimento de metástases	Referências
50	19 (38%)	-	-	-	não	Deichmann et al. (2004)
36	20 (55,5%)	-	79	43( 54 %)	sim	Goydos et al. (2005)
-	-	-	60	24 (40%)	não	Deichmann et al. (2005)
52	13 (25%)	não	-	-	-	Lang et al. (2005)
23	15 (61%)	sim	12	7 (58%)	não	Libra et al. (2005)
-	-	sim	54	24 (44%)	sim (presente durante progressão tumoral)	Kirschner et al. (2005)
59	22 ( 37%)	-	-	-	-	Saldanha et al. (2006)
82	64 (29%)/ invasores; 18(5,6%) in situ	-	-	-	-	Poynter et al. (2006)
69	33 (57%)	sim	-	-	-	Goel et al. (2006)

continuação

APÊNDICE 5 - RELAÇÃO DE ESTUDOS DA MUTAÇÃO BRAF EM MELANOMAS CUTÂNEOS E OS PARÂMETROS INVESTIGADOS

Número de lesões primárias estudadas	Número de lesões primárias com mutações BRAF (%)	Associação com iniciação da lesão	Número de lesões metastáticas estudadas	Número de lesões metastáticas com mutações BRAF (%)	Associação com progressão tumoral ou desenvolvimento de metástases	Referências
101	32 (32%)	-	-	-	-	Deichmann et al. (2006)
251	112 (45%)	-	-	-	-	Liu et al. (2007)
302	142 (47%)	-	-	-	-	Viros et al. (2008)
96	38(39,6%)	sim	15	6 (40%)	não	Jung et al. (2010)

APÊNDICE 6 - COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS NOS ESTUDOS DA MUTAÇÃO BRAF EM MELANOMAS CUTÂNEOS

Idade	Sexo	Local (todas as localizações)	Local (exposição solar intermitente)	Breslow	Clark	Mitoses	Ulceração	Regressão	Sateliteose	Nevo	Associação com prognóstico/ evolução clínica	Referência
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Davies et al. (2002)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Dong et al. (2003)
não	não	-	-	não	não	-	não	-	-	não	não	Omholt et al. (2003)
-	-	-	sim	-	-	-	-	-	-	não	não	Maldonado et al. (2003)

continua

APÊNDICE 6 - COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS NOS ESTUDOS DA MUTAÇÃO BRAF EM MELANOMAS CUTÂNEOS

Idade	Sexo	Local (todas as localizações)	Local (exposição solar intermitente)	Breslow	Clark	Mitoses	Ulceração	Regressão	Satelitose	Nevo	Associação com prognóstico/ evolução clínica	Referência
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	sim	Kumar et al. (2003)
sim	sim	não	-	não	-	-	-	-	-	-	não	Shinozaki et al. (2004)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sasaki et al. (2004)

continuação



APÊNDICE 6 - COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS NOS ESTUDOS DA MUTAÇÃO BRAF EM MELANOMAS CUTÂNEOS

Idade	Sexo	Local (todas as localizações)	Local (exposição solar intermitente)	Breslow	Clark	Mitoses	Ulceração	Regressão	Satelitose	Nevo	Associação com prognóstico/ evolução clínica	Referência
não	sim	não	-	sim	não	-	-	-	-	não	-	Thomas et al. (2004)
-	-	-	-	não	não	-	-	-	-	-	não	Deichmann et al. (2004)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Goydos et al. (2005)

continuação

APÊNDICE 6 - COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS NOS ESTUDOS DA MUTAÇÃO BRAF EM MELANOMAS CUTÂNEOS

Idade	Sexo	Local (todas as localizações)	Local (exposição solar intermitente)	Breslow	Clark	Mitoses	Ulceração	Regressão	Satelitose	Nevo	Associação com prognóstico/ evolução clínica	Referência
-	-	-	não	não	não	-	-	-	-	-	não	Deichmann et al. (2005)
-	não	-	sim	-	-	-	-	-	-	não	-	Lang et al. (2005)
não	não	não	-	não	não	-	não	não	-	-	-	Libra et al. (2005)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Kirschner et al. (2005)

continuação

APÊNDICE 6 - COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS NOS ESTUDOS DA MUTAÇÃO BRAF EM MELANOMAS CUTÂNEOS

Idade	Sexo	Local (todas as localizações)	Local (exposição solar intermitente)	Breslow	Clark	Mitoses	Ulceração	Regressão	Satelitose	Nevo	Associação com prognóstico/ evolução clínica	Referência
sim	não	-	sim	não	não	-	-	-	-	-	-	Saldanha et al. (2006)
-	-	-	sim	-	-	-	-	-	-	sim	-	Poynter et al. (2006)
sim	-	-	-	não	-	-	-	-	-	-	-	Goel et al. (2006)

continuação

APÊNDICE 6 - COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS NOS ESTUDOS DA MUTAÇÃO BRAF EM MELANOMAS CUTÂNEOS

Idade	Sexo	Local (todas as localizações)	Local (exposição solar intermitente)	Breslow	Clark	Mitoses	Ulceração	Regressão	Satelitose	Nevo	Associação com prognóstico/ evolução clínica	Referência
não	não	não	sim	não	não	-	-	-	-	-	-	Deichmann et al. (2006)
sim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	não	Viros et al. (2007)
sim	não	-	sim	sim	-	não	não	-	-	--	-	Liu et al. (2007)
sim	não	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	não	Jung et al. (2010)

**ANEXO**

TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA O HOSPITAL ERASTO GAERTNER .....	81
---	----



**ERASTO GAERTNER**

HOSPITAL ERASTO GAERTNER  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
INSTITUTO DE REABILITAÇÃO  
CENTRO DE PROJETOS DE ENSINO E PESQUISA  
REDE FEMININA

Curitiba, 31 de outubro de 2006.

**Dra. Juliana Elizabeth Jung**  
**Pesquisadora Responsável**

Prezada Sra.,

Gostaríamos de informar que o projeto de pesquisa intitulado como “**Avaliação imunoistoquímica de Marcadores de Progressão Tumoral em Melanoma Cutâneo**”, cujo número de protocolo é **P.P. nº 1422**, e tem como pesquisadora responsável V. Sa. foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e **aprovado**.

Ressaltamos que seu estudo só poderá ter início após aprovado pelo CEPEP.

Solicitamos que seja enviado um relatório semestral informando sobre o andamento do projeto e ao término do trabalho um relatório final, para darmos fechamento ao projeto. Cada alteração realizada no projeto deve ser comunicada imediatamente ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Sem mais agradecemos a atenção e colocamo-nos a disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente,

  
**Dr. Jordan Zanetti Silva**  
**Coordenador do CEP**

-----  
Membros do CEP:

Dra. Ana Luiza Gomes de Moraes Wiemann – Médica Especialista  
Enfª Ana Paula Hey – Enfermeira Especialista  
Enfª Andréa Wulf Pereira de Melo Traich – Enfermeira Especialista  
Enfª Angelita Visentim – Enfermeira Especialista  
Dr. Ariovaldo Donizetti de Abreu – Fisioterapeuta Especialista  
Dra. Clerice Nana Yamanouchi – Médica Especialista  
Dinarte Orlandi – Estatístico Especialista  
Wanda Aparecida Silva – Representante da Comunidade

Dr. Gyl Henrique Albrecht Ramos – Médico Especialista e Mestre  
Iolanda Gaivão – Psicóloga Clínica  
Dr. João Antonio Guerreiro – Médico Especialista  
Dr. Jordan Zanetti Silva – Médico e Advogado  
Jose Carlos Wiederkehr – Administrador de Empresas  
Dra. Paola Andréa Galbiatti Peduzzi – Médica Especialista  
Enfª Edenice de Oliveira Santana – Enfermeira Especialista