

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS**

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16 EM  
MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS,  
COM E SEM METÁSTASE EM LINFONODO SENTINELA**

**JORGE ANTÔNIO CALEFFI FAURI**

**Orientadora: Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss**

**Co-orientador: Dr. Lúcio Bakos**

**Dissertação de Mestrado**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS**

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16  
EM MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS, COM E SEM  
METÁSTASE EM LINFONODO SENTINELA**

**JORGE ANTÔNIO CALEFFI FAURI**

**Orientadora: Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss**

**Co-orientador: Dr. Lúcio Bakos**

**Dissertação de Mestrado**

**2008**

F266e **Fauri, Jorge Antônio Caleffi**

Expressão da proteína p16 em melanomas cutâneos primários, com e sem metástases em linfonodo sentinela / Jorge Antônio Caleffi Fauri; orient. Maria Isabel Albano Edelweiss; co-orient. Lúcio Bakos. – 2008.

86 f.: il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas. Porto Alegre, BR-RS, 2008.

1. Neoplasias cutâneas 2. Melanoma 3. Metástase neoplásica 4. Biópsia de linfonodo sentinela 5. Inibidor p16 de quinase ciclina-dependente I. Edelweiss, Maria Isabel Albano II. Bakos, Lúcio III. Título.

NLM: WR 500

*Dedico este trabalho*

*à memória de meu pai, Orpheu José Fauri, exemplo de retidão e simplicidade;*

*à minha mãe, Elvira Caleffi Fauri, por ter me transmitido perseverança e aplicação na busca de meus objetivos;*

*à minha esposa, Rosa Virgínia, por seu amor, serenidade e apoio incondicionais;*

*à minha filha Georgiana, por sua vivacidade e compreensão, tendo tornado estes momentos, mais leves;*

*a meu filho e colega de profissão, Marcelo, por sua dedicação e parceria, em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

*Inicialmente, devo agradecer àqueles que, anonimamente, tornaram possível a realização deste projeto: os pacientes.*

*Da mesma forma, a todos os funcionários e técnicos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e da Irmandade da Santa Casa de Porto Alegre, pela paciência, dedicação e competência, em suas áreas de atuação.*

*À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à centenária Faculdade de Medicina dessa universidade (FAMED), pela oportunidade dada a um ex-aluno, colocando à disposição sua gigantesca estrutura e seus recursos tecnológicos.*

*À Fundação de Incentivo à Pesquisa – FIPE, pelo financiamento do projeto.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas do HCPA/FAMED/UFRGS.*

*Aos professores do curso de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, pelos ensinamentos e orientação.*

*Aos funcionários deste programa, pela cordialidade e dedicação.*

*Ao Dr. Felice Riccardi, por sua imediata concordância em participar do levantamento dos dados dos pacientes operados na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.*

*À Dra. Liane Faccio, residente do Serviço de Patologia da Santa Casa, pelo inestimável auxílio e disponibilidade na busca eletrônica de dados e lâminas dos casos selecionados para o estudo.*

*Às funcionárias do Serviço de Patologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, pelo processamento do material necessário à pesquisa.*

*A todos os colegas de mestrado, em especial aos Drs. Eduardo Schenini (co-autor), pela amizade e parceria em todos os momentos.*

*A Sra. Neiva Coppeti, competente funcionária do Centro de Pesquisas do HCPA, pela qualidade e presteza na realização das reações imunoistoquímicas.*

*Aos patologistas do HCPA, em especial ao Dr. André Cartell, pela sua disponibilidade e competência na revisão dos casos e do artigo.*

*Ao residente do serviço de Patologia do HCPA, Dr. Denis Baroni, pela excelência das fotos da microscopia.*

*Aos patologistas da Santa Casa de Misericórdia, em especial ao Dr. Roque Furian, incansável e competente colega, pela sua amizade.*

*Ao co-orientador, Dr. Lúcio Bakos, pelo incentivo, mostrando-me que nunca é tarde quando se tem um objetivo definido.*

*Finalmente, à minha incansável orientadora, Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss, pela sua amizade, carinho e dedicação incondicionais; pelo seu profissionalismo, seriedade e dinamismo; por sua conduta ilibada e cordial, sempre disponível e atenta aos questionamentos; por sua perseverança e estímulos constantes, o meu mais profundo reconhecimento.*

## LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	– <i>American Joint Committee on Cancer</i>
ARF	– <i>Alternate reading frame</i>
BRAF	– Proteína serino-threonina, membro da família RAF das proteína-quinases.
Bcl II	– Proteína Bcl II pró ou anti-apoptótica, atua na membrana mitochondrial externa.
Bcl-6	– Proteína Bcl-6; uma 95-kDa fosfoproteína nuclear.
CDK	– Ciclinas dependentes de quinases
CDKN2A (INK4/ARF)	– <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CGH	– <i>Comparative genomic hybridization</i>
CI	– <i>Confidence Interval</i>
DNA	– <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	– Desvio padrão
E2F	– <i>Transcriptor factor E2F</i>
FIPE	– Fundo de Incentivo à Pesquisa
GBM	– Grupo Brasileiro de Melanoma
HCPA	– Hospital de Clínicas de Porto Alegre
H&E	– Hematoxilina & Eosina
HPA	– <i>Helix Pomatia Agglutinin</i>
IC	– Intervalo de confiança
IIQ	– Intervalo Interquartil
INCA	– Instituto Nacional do Câncer
INF- $\alpha$	– Interferon alfa
Ki-67	– Antígeno de proliferação celular
LNS	– Linfonodo Sentinela
LNS-	– Linfonodo Sentinela Negativo
LNS+	– Linfonodo Sentinela Positivo
MIB-1	– Clone usado referente ao anticorpo monoclonal Ki-67
M.G.G.	– <i>May Gruenwald-Giemsa</i>
MUM1	– <i>Multiple myeloma oncogene 1</i>



N	– Número de casos
NCI	– <i>National Cancer Institute</i>
OR	– <i>Odds Ratio</i>
p14 <sup>ARF</sup>	– Gene supressor de tumor, produto do <i>locus</i> CDKN2A.
p15 <sup>INK4b</sup>	– Gene supressor de tumor, inibidor das CDKs
p16	– Proteína p16, codificada pelo gene p16 <sup>INK4a</sup>
p16 <sup>INK4a</sup> (CDKN2,MTS1, INK4a)	– Gene supressor de tumor, inibidor das CDKs
p18	– Gene inibidor das ciclinas dependentes de quinases
p19 <sup>ARF</sup>	– Gene supressor de tumor e regulador da rota do p53
p21 <sup>CIP1(WAF1)</sup>	– Proteína inibidora do ciclo celular, supressora de tumor
p27 <sup>K1P1</sup>	– Proteína inibidora do ciclo celular
p53	– Proteína p53, fator de transcrição codificada pelo gene TP53.
PKC-B	– <i>Protein kinase C beta type</i>
Rb (pRB)	– Proteína do Retinoblastoma
RT-PCR	– <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SD	– <i>Standard deviation</i>
SLN	– <i>Sentinel Lymph Node</i>
SPSS	– <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
STAT1	– <i>Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa Gene</i>
S100A6	– Gene S100A6 (codifica proteína S100)
UFRGS	– Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV	– Radiação ultravioleta
UV-A	– Radiação ultravioleta A
UV-B	– Radiação ultravioleta B
VEGF	– <i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	– <i>World Health Organization</i>
9p21	– Cromossomo 9p21

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1 REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO .....	12
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
2.1 RESUMO.....	15
2.2 INTRODUÇÃO .....	16
<b>2.2.1 Epidemiologia</b> .....	16
<b>2.2.2 Características clínicas e histológicas</b> .....	19
2.3 CIRURGIA COM ABORDAGEM DO LINFONODO SENTINELA.....	22
2.4 MARCADORES MOLECULARES DO MELANOMA.....	26
2.5 GENE P16 <sup>INK4A</sup> .....	27
2.6 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	39
2.7 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA .....	41
<b>3 ARTIGO ORIGINAL</b> .....	44
3.1 RESUMO.....	45
3.2 INTRODUÇÃO .....	46
3.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	47
3.4 PLANEJAMENTO DA ANÁLISE.....	48
<b>3.4.1 Imunoistoquímica</b> .....	48
<b>3.4.2 Interpretação da p16</b> .....	49
<b>3.4.3 Interpretação anatomopatológica</b> .....	52
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	53

3.6 ASPECTOS ÉTICOS .....	53
3.7 RESULTADOS .....	54
3.8 DISCUSSÃO .....	58
3.11 AGRADECIMENTOS E FONTES DE FINANCIAMENTO .....	63
3.12 REFERÊNCIAS .....	63
<b>4 ORIGINAL ARTICLE .....</b>	<b>66</b>
4.1 ABSTRACT .....	67
4.2 INTRODUCTION .....	68
4.3 MATERIAL AND METHODS .....	69
4.4 IMMUNOHISTOCHEMISTRY .....	70
4.5 p16 <sup>INK4a</sup> INTERPRETATION .....	71
4.6 HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS .....	74
4.7 STATISTICAL ANALYSIS .....	75
4.8 ETHICAL ISSUES .....	75
4.9 RESULTS .....	76
4.10 DISCUSSION .....	80
4.11 ACKNOWLEDGEMENTS AND SOURCE OF FUNDING .....	84
4.12 REFERENCES .....	85

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência do melanoma cutâneo tem aumentado, significativamente, em todo o mundo, mais rapidamente do que qualquer outra neoplasia maligna. O aumento anual de sua taxa de incidência varia entre as populações: em caucasianos, encontra-se na ordem de 3 a 7% ao ano;<sup>1</sup> no Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer - INCA, 5920 casos novos da doença surgirão, somente, em 2008.<sup>2</sup>

Na busca da redução do número de casos dessa neoplasia, campanhas de proteção e redução à exposição solar, seguimento de familiares de pacientes com melanoma e pesquisas, cada vez mais elaboradas, têm sido realizadas.

De acordo com a Academia Americana de Dermatologia, morre uma pessoa, a cada hora, em decorrência do melanoma maligno.<sup>3</sup> Estima-se que 62.480 homens e mulheres (34.950 homens e 27.530 mulheres) serão diagnosticados com a doença, e 8.420 homens e mulheres morrerão em consequência do melanoma cutâneo, em 2008, segundo o *National Cancer Institute* - NCI, dos Estados Unidos.<sup>4</sup>

Segundo este mesmo instituto, a idade mediana para o diagnóstico do melanoma cutâneo, calculada no período de 2001 a 2005, foi de 59 anos. Aproximadamente, 0,9% foram diagnosticados antes dos 20 anos de idade; 8,1% entre 20 e 34 anos; 12,9% entre 35 e 44; 16,4% entre 75 e 84 e 5,5% com 85 ou mais, anos de idade. A taxa de incidência ajustada, para a idade, foi de 19,4% por 100.000 homens e mulheres, por ano (homens 24,6% e mulheres 15,6% /100.000, por ano).<sup>4</sup>

Pacientes com melanomas mais finos, sem metástase linfonodal, apresentam melhor prognóstico.<sup>5</sup> O comprometimento linfonodal é um indicador de menor chance de sucesso no tratamento dessa neoplasia.<sup>6</sup> Com a publicação, em 1992, da técnica de pesquisa do linfonodo

sentinela (LNS), houve um grande avanço na detecção de micrometástases do melanoma. A conduta terapêutica cirúrgica e adjuvante passou a ter outro enfoque, tornando-se, praticamente, padronizada em centros de tratamento de melanoma.<sup>7</sup> Antes do desenvolvimento dessa técnica, somente eram diagnosticadas as metástases linfonodais, por meio do exame clínico, ou seja, quando se tornavam palpáveis, o que retardava o tratamento desses pacientes.

Embora várias modalidades de terapia (quimioterapia, imunoterapia) complementem a ressecção cirúrgica e tenham tido grande avanço nos últimos anos, ainda se observa uma alta taxa de mortalidade entre os pacientes com melanoma. Com isso, foi iniciada uma busca de fatores prognósticos que pudessem auxiliar na escolha de tratamentos mais adequados a cada paciente.

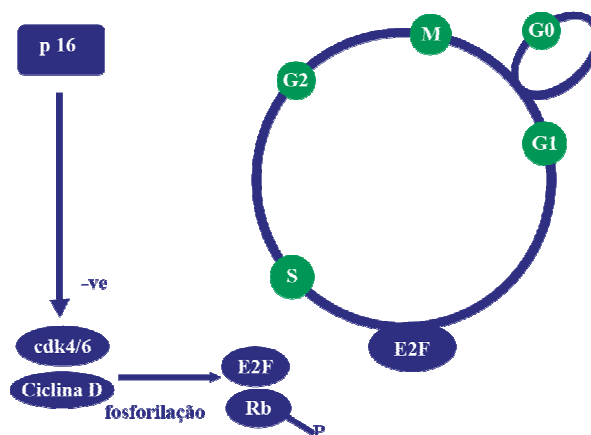
O desenvolvimento da biologia molecular e, mais precisamente, da oncologia molecular, dos estudos genéticos e identificação do processo de regulação do ciclo celular, foram importantes na elucidação da origem de muitas neoplasias, entre elas, o melanoma.

A procura de marcadores mais específicos que permitam o diagnóstico e estadiamento precoce do melanoma, como o mapeamento genético, por exemplo, ocupam pesquisadores em todo o mundo. Convencionalmente, a análise e a classificação histopatológica de um tumor são realizadas pela microscopia óptica e pela imunoistoquímica. Diferentes ensaios são necessários para realizar essa classificação e para reconhecer a perda da expressão ou a superexpressão de um determinado gene (e sua proteína), o que pode ser decisivo para avaliar a evolução clínica de um paciente ou a conduta terapêutica a ser tomada. Muitas vezes, lesões precursoras de tumores, consideradas benignas, podem apresentar alterações moleculares importantes, características de verdadeiras neoplasias. Os estudos moleculares poderiam detectar essas alterações e auxiliar o médico na decisão sobre a conduta terapêutica mais adequada.

Estudos de ligação genética, em pacientes com síndrome do nevo displásico, permitiram a identificação do *locus*, no cromossomo 9p21, fortemente associado ao desenvolvimento de melanomas. Pelo menos três genes mapeiam em 9p21, no *locus* INK4a/ARF: os genes dos inibidores de CDK, CDKN2B e CDKN2A (que produzem as proteínas p15<sup>INK4b</sup> e p16<sup>INK4a</sup>, respectivamente) e ARF (que produz a proteína p14<sup>ARF</sup> em humanos, e p19<sup>ARF</sup> em camundongos). O gene p16<sup>INK4a</sup> inibe a habilidade das ciclinas dependentes de quinases CDK4 e CDK6 de ativar substratos críticos necessários para a progressão do ciclo celular, da fase G<sub>1</sub> para a fase S. O gene p16<sup>INK4a</sup> parece desempenhar papel fundamental na progressão do melanoma, enquanto aberrações (mutação, deleção homozigótica), envolvendo outros produtos do *locus* CDKN2A, como p14, p15 e p18, são extremamente raras nas linhas celulares de melanomas e em melanomas esporádicos. Mutações do gene p16<sup>INK4a</sup> são encontradas em 25% das famílias com melanoma hereditário.<sup>8</sup>

Em 1997, um estudo com melanomas do subtipo espalhamento superficial e nodulares demonstrou altos níveis de expressão da proteína p16 em nevos melanocíticos benignos, com menores níveis de expressão em nevos displásicos. Níveis progressivamente menores de expressão da p16 foram demonstrados em melanomas primários e metastáticos. Esses estudos sugerem que a perda de expressão da proteína p16 está associada não somente com a transformação precoce de lesões benignas, mas também com a progressão tardia da doença maligna em estágio invasivo.<sup>9</sup>

Em 2000, outro estudo mostra que, em melanomas acrais, a perda da expressão da proteína p16 promove a proliferação celular ao desregular a atividade de CDK4 e CDK6 e reduzir o nível da proteína retinoblastoma (Rb) hipofosforilada, pois essas quinases, ao fosforilar a Rb, liberam fatores de transcrição como o E2F, necessários para a replicação do DNA e progressão do ciclo celular (Figura 1).<sup>10</sup>



**Figura 1:** Diagrama da ação da proteína p16: a fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb), resulta na liberação de fatores de transcrição (E2F), o que induz à replicação do DNA e à progressão do ciclo celular. A proteína p16 é inibidora desta rota, ao prevenir a associação da ciclina D às enzimas quinases (CDK4 e CDK6) que fosforilam Rb.

Muitos anticorpos foram isolados e, com o auxílio da imunohistoquímica, utilizados na confirmação diagnóstica e até prognóstica do melanoma. A expressão da proteína p16 tem sido utilizada por inúmeros pesquisadores para avaliar prognóstico da doença.

O objetivo deste estudo é verificar a expressão da proteína p16 em melanomas cutâneos, com e sem metástase linfonodal (LNS).

### 1.1 REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- 1 Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous melanoma. Br J Dermatol 2004;150(2):179-85.
- 2 Ministério da Saúde do Brasil – INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>><[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=335](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335)> Acesso: 17.jul.2008

- 3 Pan Z. Principal component analysis based visualization and human melanoma classification. CMSC 838b Term Paper. University of Maryland, College Park, MD 20742. Disponível em: [http://www.cs.umd.edu/class/spring2001/cmssc838b/Project/Zhijian\\_Pan/pca.pdf](http://www.cs.umd.edu/class/spring2001/cmssc838b/Project/Zhijian_Pan/pca.pdf).
- 4 National Cancer Institute – Melanoma 208/01302. National Cancer Institute p.1-15. Disponível em: <http://cancerweb.ncl.ac.uk/cancernet/101302.html> Acesso: 20.Mar.2008
- 5 Fearfield LA, Larkin JM, Rowe A, A'Hern R, Fisher C, Francis N, et al. Expression of p16, CD95, CD95L and Helix pomatia agglutinin in relapsing and nonrelapsing very thin melanoma. *Br J Dermatol* 2007 Mar; 156(3):440-7.
- 6 Alitalo K, Mohia S, Ruosiahti E. Lymphangiogenesis and cancer: meeting report. *Cancer Res* 2004;64:9225-9.
- 7 Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*. 1992 Apr; 127(4):392-9.
- 8 Carlson JA, Ross JS, Slominski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, et al. Molecular diagnostics in melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2005 May; 52(5):743-75.
- 9 Chana JS, Grover R, Wilson GD, Sanders R. p16 protein expression in benign and malignant melanocytic lesions. *Melanoma Res* 1997;7(S1):28.
- 10 Chana JS, Grover R, Wilson GD, Hudson DA, Forders M, Sanders R, et al. An analysis of p16 tumor suppressor gene expression in acral lentiginous melanoma. *Brit J of Plast. Surg* 2000; 53, 46-50.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### A PROTEÍNA p16 E O MELANOMA CUTÂNEO

Fauri JAC<sup>1</sup>, Diehl ES<sup>2</sup>, Cartell A<sup>3</sup>, Bakos L<sup>4</sup>, Edelweiss MIA<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Mestre em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup> Mestre em Clínica Médica, Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

<sup>3</sup> Professor Auxiliar, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

<sup>4</sup> Professor Titular de Dermatologia, Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

<sup>5</sup> Professora Associada, Departamento de Patologia, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

#### Endereço para correspondência:

JORGE ANTÔNIO CALEFFI FAURI  
Av. Maryland, 1367 ap. 902  
CEP:90.440-191 - Porto Alegre - RS.  
Telefone: 3332.0339  
e-mail: fauri47@gmail.com

## 2.1 RESUMO

Nas últimas décadas, é intensa a procura de uma explicação genética sobre a origem, crescimento e progressão do melanoma cutâneo. A tentativa de encontrar uma ligação direta entre as mutações gênicas e a origem da doença tem sido o objetivo dos pesquisadores dedicados ao estudo dessa neoplasia. Diversos métodos são utilizados na busca de uma avaliação prognóstica para a progressão do melanoma, citando-se, entre eles, a pesquisa do linfonodo sentinela, a imunoistoquímica, as técnicas moleculares e a técnica de *microarray*. A necessidade de estabelecer um método, com excelente sensibilidade e especificidade, tem levado os pesquisadores a buscarem melhores evidências. É importante para esses estudos a obtenção de dados confiáveis sobre as técnicas, progressão e sobrevida livre de doença. Por meio da imunoistoquímica, técnica relativamente simples e de baixo custo, a expressão da proteína p16 pode ser analisada e correlacionada com o prognóstico da doença. No melanoma cutâneo, a expressão da proteína diminui, à medida que aumenta sua agressividade, ou seja, é forte nos nevos e melanomas *in situ*, e fraca ou ausente nos melanomas metastáticos. Em alguns estudos, a comparação com outros marcadores é analisada. A finalidade deste estudo é fazer uma revisão da literatura internacional sobre o uso da proteína p16 como fator prognóstico para o melanoma, bem como avaliar a importância das alterações do gene p16<sup>INK4a</sup>, co-responsáveis pela gênese e evolução do melanoma.

**Palavras-chave:** melanoma cutâneo; p16<sup>INK4a</sup>; imunoistoquímica; prognóstico.

## 2.2 INTRODUÇÃO

### 2.2.1 Epidemiologia

Considerado o mais agressivo dos tumores da pele, o melanoma cutâneo mantém-se na liderança das mortes por câncer de pele nos países industrializados.<sup>1</sup> A sua incidência vem aumentando, significativamente, em todo o mundo, mais rapidamente do que qualquer outro tipo de neoplasia maligna.

A Organização Mundial de Saúde – *World Health Organization* (WHO) – estima que, anualmente, ocorram, em torno de 132 mil casos novos de melanoma no mundo, com uma prevalência em torno de 2,5%.<sup>2</sup>

Nos Estados Unidos, é considerada a doença com crescimento mais rápido, em ambos os sexos, no período de 1973 a 1997, e, em 2002, a incidência foi seis vezes maior do que em 1950. Estima-se a duplicação dessa incidência a cada 10-20 anos. Em média, variando entre populações, o aumento da incidência anual está na ordem de 3 a 7% em caucasianos.<sup>3</sup> Na Austrália, é o quarto tipo mais comum de câncer entre os homens (depois de câncer de próstata, intestino e pulmão), e o terceiro mais comum entre as mulheres (depois de câncer de mama e intestino).<sup>3</sup>

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se 2.950 casos novos de melanoma em homens, e 2.970 em mulheres, totalizando 5.920 casos novos da doença somente em 2008. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul. Também para o ano de 2008, a previsão é que ocorram 870 novos casos no Rio Grande do Sul, sendo 140 na capital, Porto Alegre. O melanoma de pele é menos freqüente – 4% dos casos de neoplasias da pele – do que os outros tumores de pele (basocelulares e de

células escamosas). No entanto, sua letalidade é maior.<sup>2</sup>

A ocorrência do melanoma familiar foi reconhecida, há mais de 50 anos. Aproximadamente, 10% dos casos de melanoma surgem em ambientes familiares. Supõe-se que carreguem uma susceptibilidade hereditária para a doença. Estudos epidemiológicos, reconhecendo a importância da história familiar na determinação do risco para o surgimento do melanoma, salientam, também, a importância da exposição solar, o número de nevos congênitos de determinado indivíduo, o tipo de pele, cor do cabelo e dos olhos, bem como a distribuição dos nevos na pele.<sup>4</sup>

Observa-se um expressivo crescimento na incidência desse tumor em populações de cor de pele branca. Quando os melanomas são detectados em estádios iniciais, possuem um bom prognóstico quanto à sua cura. Nos últimos anos, verifica-se uma grande melhora na sobrevivência dos pacientes com esse tipo de câncer, principalmente, devido a essa detecção precoce. Nos países desenvolvidos, a sobrevivência média estimada, em cinco anos, é de 73%, enquanto, nos países em desenvolvimento, é de 56%. A média mundial desta sobrevivência estimada é de 69%.<sup>2</sup>

A maioria dos cânceres de pele ocorre devido à exposição excessiva ao sol. No Brasil, país tropical, o câncer mais freqüente é o de pele, correspondendo a 25% de todos os tumores diagnosticados em todas as suas regiões geográficas. Os raios ultravioletas (UV) são classificados, de acordo com seu comprimento de onda, em UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) e UV-C (100 a 280 nm). Em decorrência da destruição da camada de ozônio, os raios UV-B, intrinsecamente relacionados ao surgimento do câncer de pele, têm aumentado, progressivamente, sua incidência sobre a terra. Os raios UV-A, por sua vez, independem dessa camada e causam câncer de pele em indivíduos que se expõem a essa radiação em horários de alta incidência, continuamente, e ao longo de muitos anos.

As pessoas de pele clara, habitantes em regiões de alta incidência de luz solar apresentam maior risco. Sendo a população brasileira constituída de mais de 50% de pessoas de pele clara (Quadro 1) que se expõem, muito e descuidadamente, ao sol, independentemente do motivo (trabalho ou lazer), e, sendo o Brasil um país situado, geograficamente, em zona de alta incidência de raios UV, é previsível a alta ocorrência do câncer de pele entre a população rural ou urbana.<sup>2</sup>

<b>Tipo de pele</b>	<b>Cor da pele</b>	<b>Características</b>
I	Branca; muito pálida; cabelo loiro ou ruivo; olhos azuis; sardas	Sempre queima, nunca bronzeia
II	Branca; pálida; cabelo loiro ou ruivo; olhos azuis, verdes ou marrom-esverdeados	Normalmente queima, bronzeia com dificuldade
III	Pele menos pálida com qualquer cor de cabelo ou olhos; muito comum	As vezes queima, bronzeia gradualmente
IV	Morena; típica pele mediterrâneo-caucasiana	Raramente queima; bronzeia com facilidade
V	Morena escura; tipo de pele do Oriente Médio	Muito raramente queima; bronzeia muito facilmente
VI	Preta	Nunca queima; bronzeia muito facilmente

**Quadro 1:** Quadro referente à escala de classificação de Fitzpatrick sobre tipos de pele<sup>5</sup>

Os cânceres de pele são classificados em tumores de pele não melanoma e melanomas. Dentre os não melanomas, estão o carcinoma basocelular e o epidermóide.

O melanoma cutâneo origina-se nos melanócitos – células produtoras de melanina – e tem predominância em adultos brancos. Embora represente apenas 4% dos tipos de câncer de pele, é o mais grave devido à sua alta potencialidade para gerar metástases.<sup>2</sup>

### 2.2.2 Características clínicas e histológicas

Variáveis clínicas, incluindo número de linfonodos ou metástases a distância, e histológicas que podem prever a sobrevida, como a espessura do tumor (índice de Breslow), tamanho do tumor, ulceração ou invasão vascular e índice mitótico, têm sido valorizadas no melanoma cutâneo (Figura 1).



**Figura 1.** Aspecto clínico de um melanoma cutâneo nodular

Segundo Barnhill<sup>6</sup>, a maioria dos melanomas inicia como proliferações intra-epiteliais que podem, ou não, ter relação com nevos melanocíticos preexistentes.

O critério histopatológico para o diagnóstico e as tentativas na classificação do melanoma relacionam-se com as propriedades mais importantes dessas lesões que resultaram em recorrências e metástases em pacientes sob criterioso acompanhamento. Esses vários critérios são avaliados juntamente com as informações clínicas, como idade, localização da lesão, grau de exposição ao sol, origem em nevo de qualquer tipo ou outra lesão precursora.

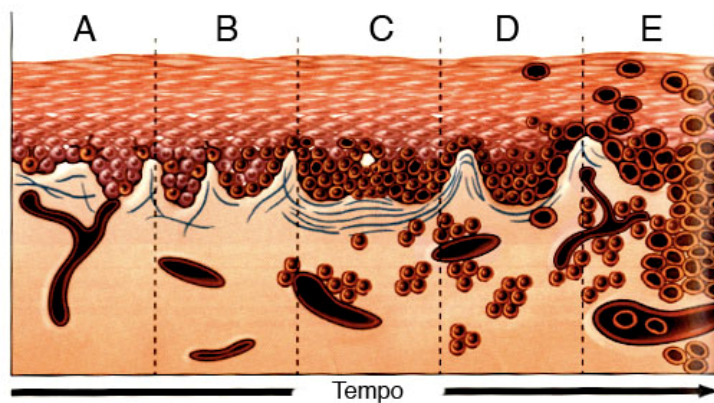
Uma vez que não há critério absoluto para o diagnóstico do melanoma, toda informação deve ser, sistematicamente, reunida ao realizar-se uma interpretação diagnóstica. Em geral, a classificação em uso é falha e artificial, pois faltam muitas informações biológicas. Partindo desse princípio, foi proposta uma maneira prática para classificação do melanoma que pode ser observada no Quadro 2.

<b>Melanomas convencionais</b>
<p>Componente intra-epitelial categorizado como pagetóide, lentiginoso, aninhado, ou dois ou mais padrões</p> <p>Melanomas <i>in situ</i> (intra-epiteliais).</p> <p>Melanomas intra-epiteliais com invasão dérmica, subcutânea, etc.</p> <p>Ausência de componente intra-epitelial</p>
<b>Melanomas convencionais subclassificados por diferenças etiológicas/anatômicas</b>
<p>Melanomas solares</p> <p>Melanomas acrais</p> <p>Melanomas de mucosa</p>
<b>Variantes raras ou não usuais de melanoma</b>
<p>Desmoplástico-neurotrópico</p> <p>Neurotrópico</p> <p>Melanomas lembrando nevos (melanoma nevóide; melanoma spitzóide)</p> <p>Melanomas surgindo em, ou lembrando nevo azul (nevo azul maligno)</p> <p>Melanomas surgindo em nevo intradérmico</p> <p>Melanomas surgindo em nevo congênito</p> <p>Melanomas lembrando melanomas espontâneos e induzidos em animais</p> <p>Melanoma verrucoso</p> <p>Pleomórfico (sarcomatóide)</p> <p>Melanoma de pequenas células</p> <p>Melanoma de células em balão</p> <p>Melanoma em anel-de-sinete</p> <p>Rabdóide</p> <p>Mixóide</p> <p>Sarcoma de células claras (Melanoma maligno de partes moles)</p>

**Quadro 2.** Classificação prática do melanoma maligno, segundo Barnhill<sup>6</sup>

Essa classificação faz referência, por outro lado, à classificação histórica do melanoma, porque ainda é utilizada por muitos e, sob certos aspectos, é útil.

Clark<sup>7</sup> e Clark et al.<sup>8</sup> classificaram os melanomas de acordo com o seu grau de crescimento horizontal ou de invasão dérmica (Figura 2), em cinco níveis, como pode ser visto no Quadro 3.



**Figura 2.** Fases da progressão tumoral no nevo displásico até melanoma: A – Hiperplasia melanocítica lentiginosa; B – Nevo juncional lentiginoso; C – Nevo composto lentiginoso com arquitetura anormal e aspectos atípicos citológicos (nevo displásico); D – Fase de crescimento radial do melanoma; E – Fase de crescimento vertical, com disseminação maligna na derme e vasos.<sup>9</sup>

Nível	Grau de invasão - pele/subcutâneo
I	Lesões envolvendo apenas a epiderme ( <i>melanoma in situ</i> )
II	Invasão da derme papilar, mas não atinge a interface papilar-reticular da derme
III	A invasão preenche e expande a derme papilar, mas não penetra na derme reticular.
IV	Invasão da derme reticular, mas não do tecido subcutâneo.
V	Invasão do subcutâneo através da derme reticular.

**Quadro 3.** Classificação dos melanomas segundo os níveis de Clark<sup>10</sup>



A classificação, segundo Breslow, baseou-se na espessura do tumor (em mm), como pode ser visto no Quadro 4.<sup>10</sup>

<b>Espessura</b>	<b>Classificação</b>
0,75 mm ou menos	Melanomas finos
0,76 mm a 4,0 mm	Melanomas intermediários
4,0 mm ou mais	Melanomas espessos

**Quadro 4.** Classificação simplificada segundo a espessura do melanoma<sup>10</sup>, conforme Breslow

A exposição ao sol e a susceptibilidade genética, como mencionado anteriormente, têm sido propostas como principais fatores etiológicos que, de certa forma, explicam a incidência aumentada da doença.

Os melanomas metastáticos apresentam resposta muito pobre a qualquer tipo de terapia, com uma probabilidade de sobrevida em cinco anos, variando entre 0 e 30%. Geralmente, o melanoma cutâneo maligno desenvolve-se em três diferentes estágios: fase de crescimento radial; fase de crescimento vertical e doença metastática<sup>1</sup>.

### 2.3 CIRURGIA COM ABORDAGEM DO LINFONODO SENTINELA

Antes do advento da técnica de pesquisa do linfonodo sentinela (LNS), o tratamento cirúrgico era realizado por meio da ressecção da lesão primária com margens ampliadas, já na primeira abordagem, não havendo consenso em relação à profundidade da ressecção. Discutia-se, inclusive, se a aponeurose muscular deveria ou não ser removida na região correspondente à ressecção da pele e subcutâneo. Essa conduta cirúrgica mudou,

drasticamente, do ponto de vista tático-operacional, após o surgimento da técnica da pesquisa do LNS.

A controvérsia sobre a abordagem cirúrgica dos linfonodos regionais, em estágios precoces do melanoma, inicia com Herbert Snow, em 1892, que preconizava a excisão ampliada da lesão primária e a dissecação linfonodal eletiva como um método de controle da permeação linfática de metástases. Seus estudos sugeriam uma conexão direta entre a lesão primária e os linfonodos regionais, indicando que o tratamento do melanoma deveria, rotineiramente, incluir a excisão desses linfonodos.<sup>11</sup>

Em 1977, Cabanas<sup>12</sup> estudou o tratamento de 100 casos de carcinoma de pênis, em detalhe, utilizando-se de linfoangiogramas, disseções anatômicas e/ou avaliação microscópica. Os linfoangiogramas eram realizados através dos linfáticos do dorso do pênis, demonstrando a existência de um linfonodo específico, chamado LNS, que parecia ser o local primário das metástases do carcinoma do pênis. O LNS é visualizado, radiograficamente, na incidência ântero-posterior, na junção da cabeça femoral e ramo ascendente do púbis. Anatomicamente, neste local, o LNS é parte do sistema linfático em torno da veia epigástrica superficial. Quarenta e seis biópsias de LNS foram realizadas, sendo quinze positivas para doença metastática. Nesses quinze pacientes, uma dissecação inguino-femoral foi realizada; em doze casos, não havia envolvimento de outros linfonodos. Canais linfáticos, drenando para os linfonodos ilíacos, sem primeiro drenar para o LNS, nunca foram demonstrados, nem os linfonodos ínguino-femorais comprometidos, na ausência de envolvimento do LNS.

Baseado nisso, Cabanas recomendava biópsia bilateral do LNS, seguida da dissecação inguino-fêmoro-ilíaca, quando a biópsia fosse positiva. Se negativa, nenhum procedimento cirúrgico adicional era recomendado.<sup>12</sup>

Em 1992, Morton et al.<sup>13</sup>, tratando, cirurgicamente, o melanoma cutâneo, descreveram, pela primeira vez, um procedimento, utilizando um corante vital que permitia a

identificação intra-operatória do linfonodo sentinela (LNS), ou seja, o linfonodo mais próximo do local do melanoma primário, na via de drenagem direta. Sendo o local mais provável de metástases precoces, o LNS poderia ser removido para estudo intra-operatório imediato, a fim de identificar células de melanoma clinicamente ocultas. Nesse trabalho, identificaram, com sucesso, o LNS em 194 de 237 bacias linfáticas. Encontraram metástases em quarenta espécimes (21%) que possuíam um LNS detectável no exame de lâminas coradas pela hematoxilina & eosina (H&E) (12%) ou, exclusivamente, nas preparações de coloração por imunohistoquímica (9%). Metástases estavam presentes em 47 (18%) de 259 LNS, enquanto linfonodos não-sentinelas eram o único local de metástases em somente dois de 3.079 linfonodos de 194 espécimes de linfadenectomia que possuíam um LNS identificável, uma taxa de falso-negativo menor do que 1%. Portanto, essa técnica identifica, com alto grau de acurácia, pacientes com estágios precoces de melanoma com metástases linfonodais e passíveis de se beneficiar da linfadenectomia radical.

Essner et al.<sup>14</sup>, em 2000, padronizaram a utilização da linfocintilografia para todos os casos de melanoma, seguida da pesquisa intra-operatória do LNS, pelo uso do “Gama Probe”, um aparelho portátil composto de sonda de detecção e sistema de registro digital da radiação gama.<sup>15</sup>

Com mais de dez anos de experiência, Essner<sup>11</sup> confirmou a baixa taxa de recorrência linfonodal e mínima morbidade, utilizando o mapeamento linfático e a biópsia do LNS. Permanece, entretanto, a controvérsia: o método do mapeamento linfático e biópsia do LNS é procedimento diagnóstico ou intervenção terapêutica? Três grandes estudos examinam a utilidade terapêutica desse método. O primeiro, denominado *Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial I*, iniciado em 1994, por Essner<sup>11</sup>, avaliou o benefício terapêutico da pesquisa do LNS e a acurácia da técnica. Comparou a excisão ampliada do tumor primário associada à pesquisa do LNS com a excisão ampliada (somente) do tumor primário, em

pacientes estádios I e II (AJCC). Em março de 2002, já haviam entrado, no estudo, 2.001 pacientes. Os resultados preliminares validaram a acurácia do mapeamento linfático e a biópsia do LNS como procedimentos úteis para estadiamento. O segundo estudo, iniciado em 2005 (*Multicenter Lymphadenectomy Trial III*), avaliou pacientes com LNS positivo, identificados pela coloração com H&E, técnicas de imunoistoquímica e por RT-PCR (transcriptase reversa-PCR). Os pacientes foram submetidos à linfadenectomia radical – embora, na maioria dos casos, as metástases encontravam-se apenas no linfonodo sentinela –, com o intuito de avaliar o benefício terapêutico deste procedimento. Múltiplos fatores clínico-patológicos, como espessura do tumor  $\geq 3$ mm, idade e elevado índice mitótico, entre outros, sugeriram, mas não são absolutamente preditivos de metástases nos linfonodos não sentinelas.<sup>11</sup> Realizado pelo grupo do *Sunbelt Melanoma Trial*, o terceiro estudo, randomizado prospectivo, examinou o valor terapêutico da linfadenectomia radical e o uso de Intron A (INF- $\alpha$ , Schering-Plough, Kenilworth, NJ), em pacientes com LNS, contendo células tumorais identificadas por coloração convencional com H&E, técnicas de imunoistoquímica e/ou avaliação por RT-PCR de espécimes frescos. Os organizadores desse estudo antecipam que o ensaio poderá trazer melhor entendimento do valor terapêutico do mapeamento linfático e pesquisa do LNS e subsequente tratamento com Intron A.<sup>16</sup>

Com relação ao significado biológico das metástases em LNS, Essner extraiu duas hipóteses: 1ª) ação incubadora, ou seja, sugere que as metástases se desenvolvem nos linfonodos regionais que permitem a expansão de clones metastáticos e a subsequente disseminação a distância. Estando essa hipótese correta, a remoção precoce dos linfonodos regionais deveria reduzir a incidência de metástases a distância e aumentar a sobrevida, quando comparados a pacientes com remoção tardia dos linfonodos regionais. 2ª) ação marcadora: sugere que as metástases para os linfonodos regionais são somente indicativas de um fenótipo metastático e a remoção dos linfonodos seria diagnóstica para metástases a

distância, ocultas. Portanto, nesse caso, a remoção das metástases linfonodais seria apenas paliativa, sem oferecer nenhum significado terapêutico.

De qualquer forma, seja qual for a hipótese correta, as primeiras metástases do melanoma, geralmente, vão para os linfonodos regionais ou LNS. Por ser o LNS o primeiro local de metástase, sua avaliação é uma oportunidade única para o estudo das fases precoces da interação imunológica tumor-linfonodo. Evidências recentes, pesquisadas por Cochran et al.<sup>17</sup>, sugeriram que os LNS estão imunossuprimidos quando comparados com os linfonodos adjacentes não sentinelas. Alitalo et al.<sup>18</sup>, ao estudarem a linfoangiogênese, questionaram se a progressão das metástases para outros órgãos (metástases a distância) dar-se-ia por via linfática ou pelos vasos sanguíneos.

Ainda assim, casos com metástase linfonodal podem passar sem identificação. Daí a busca por marcadores tumorais mais específicos. A utilização da imunohistoquímica para avaliar a expressão da proteína p16 – pelo baixo custo e simplicidade do método –, e correlacioná-la com o prognóstico da doença, é uma das técnicas apresentadas em vários trabalhos da literatura mundial.

## 2.4 MARCADORES MOLECULARES DO MELANOMA

O melanoma cutâneo, freqüentemente, mostra um comportamento clínico imprevisível. Como já mencionado anteriormente, enquanto a espessura do tumor primário é o fator prognóstico independente mais importante para determinar sobrevivência, observa-se que pacientes com tumores mais espessos, por vezes, não apresentam metástases, e outros, com melanomas finos, morrem em consequência da doença.<sup>19</sup>

Por meio da patologia molecular, com seus contínuos progressos tecnológicos, houve a possibilidade de reconhecer a predisposição e identificar estados subclínicos das doenças. Observou-se que metástases podem ocorrer em pacientes com melanomas finos, e a pesquisa do linfonodo sentinela não identifica todos os pacientes com risco para metástases a distância.

Existem novos marcadores correlacionados com a progressão do melanoma. Estudos suplementares como o do Ki-67 (MIB-1) e outros marcadores celulares, p53, proteína S100A6, telomerase, BRAF, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), hibridização genômica comparativa (CGH), análise proteômica funcional ou expressão de grupos de genes (*arrays*) aumentarão a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico de melanoma em casos histologicamente ambíguos e poderão ser úteis na identificação, prognóstico e detecção de doença residual mínima e/ou recorrência precoce. Dados recentes mostram que esses marcadores poderiam ser úteis para determinar quais pacientes se beneficiariam com um determinado tratamento ou para monitorar uma resposta terapêutica.<sup>20</sup>

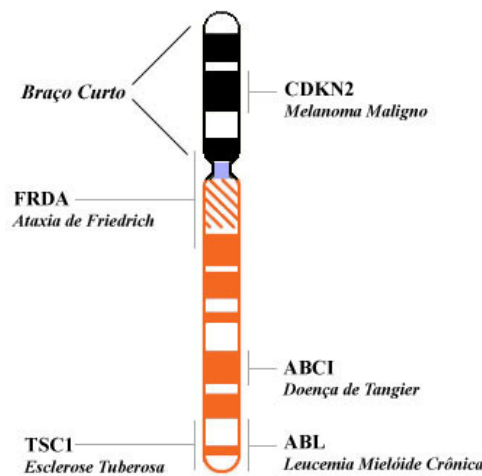
A cada novo gene descoberto, relacionado a determinado tipo de câncer, fica a dúvida se essa descoberta poderá acrescentar algo para o diagnóstico, prognóstico e tratamento do mesmo. Os testes realizados para identificar essas alterações são denominados testes genéticos. A história do teste genético começa com o DNA – uma enorme base de dados químicos localizada no núcleo de cada uma das células do corpo – e carrega um completo conjunto de instruções para produzir as proteínas que as células necessitam.

## 2.5 GENE P16<sup>INK4A</sup>

O gene supressor de tumor CDKN2A (p16<sup>INK4a</sup>), localizado no cromossomo 9p21, codifica duas proteínas de baixo peso molecular, inibidoras do ciclo celular: p16<sup>INK4a</sup> e

p14<sup>ARF</sup>, de uma seqüência genômica parcialmente compartilhada. A primeira atua no controle do ciclo celular, no *check point* G1-S, através da ligação a quinases ciclino-dependentes 4 e 6 (CDK4 e CDK6), inibindo a formação dos complexos ativos CDK-ciclina D. A segunda, chamada de p14<sup>ARF</sup> (em humanos), é também conhecida por p19<sup>ARF</sup> (em ratos).

O gene p16<sup>INK4a</sup> (Figura 3) está, freqüentemente, alterado em vários tipos de tumores, e torna-se inativo por mutações na linha germinativa em, aproximadamente, 20% das famílias estudadas propensas a desenvolverem melanoma. Tem sido observada uma susceptibilidade desse gene para o melanoma, porque ele promove as funções inibitórias de crescimento do retinoblastoma (Rb). Em melanomas esporádicos, várias alterações do p16<sup>INK4a</sup> têm sido relatadas.<sup>21,22</sup> Sua inativação resulta em regulação anormal do ciclo celular de neoplasias em humanos. Tem sido atribuído papel importante aos ativadores da hipermetilação, em mecanismo de inativação do gene p16<sup>INK4a</sup>, na gênese de tumores.<sup>23</sup>



**Figura 3.** Cromossomo 9<sup>24</sup>

Em 1993, Serrano et al.<sup>25</sup> mostraram que o ciclo de divisão de células eucarióticas é regulado por uma família de proteoquinases conhecidas como quinases ciclino-dependentes

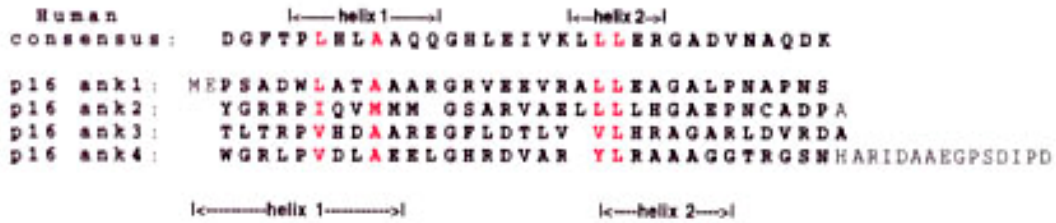
(CDKs). A ativação seqüencial de membros individuais dessa família e suas conseqüentes fosforilações de substratos críticos promovem progressão ordenada pelo ciclo celular. Os complexos formados pela CDK4 e o tipo D de ciclinas estão fortemente implicados no controle da progressão celular, durante a fase G1. Esses autores, utilizando técnicas de biologia molecular (uso de plasmídeos), demonstraram que a p16 interage, especificamente, com CDK4.

Para investigar o modo de ação dessa proteína, supressora de tumor, McConnel et al.<sup>26</sup> utilizaram células U2-OS, células epiteliais do osteossarcoma humano, originalmente conhecidas como linha 2T, consagradas em 1964, nas quais a expressão da p16 pode ser regulada pela adição ou remoção de isopropilranosídeo. Como esperado, a indução do p16<sup>INK4a</sup> resulta na parada do ciclo celular em G1 por inibição da fosforilação da proteína Rb (pRb) pelas quinases ciclino-dependentes CDK4 e CDK6. Por outro lado, a indução do p16<sup>INK4a</sup> também causa marcada inibição da atividade da CDK2.

Mutações de ponto no gene p16<sup>INK4a</sup>, também conhecido como p16, CDKN2, MTS1 e INK4a, são encontradas em vários tipos de tumor. Em virtude da função dos produtos derivados dessas mutações naturais não terem sido completamente exploradas, Wendell et al.<sup>27</sup> investigaram as atividades funcionais de um largo espectro de ocorrências naturais de mutações em proteínas p16. Para isso, dezesseis proteínas p16 mutantes, associadas ao câncer, resultantes de mutações com sentido trocado (troca de aminoácido – *missense mutation*), foram caracterizadas pela sua habilidade em se unir e inibir as quinases ciclino-dependentes – CDK4 e CDK6 – e induzir a parada do ciclo celular na fase G1. Concluíram os pesquisadores que, entre as dezesseis mutações examinadas, nove tinham defeitos funcionais detectáveis, e três mutantes (D84V, D84G e R87P) tinham defeitos na ligação à CDK, na inibição da quinase e na parada do ciclo celular. As mutações correspondentes estão localizadas na terceira seqüência de aminoácidos, em torno de 33, conhecida como *ankyrin repeats* (Figura



4), numa região altamente conservada, onde se acredita seja produzida a clivagem para a ligação da CDK.



**Figura 4.** Um alinhamento da seqüência de aminoácidos da p16 com a seqüência de consenso (seqüência de DNA com estrutura e função similares em diferentes organismos) para repetições tipo anquirinas. O consenso humano foi gerado utilizando seqüências de repetições tipo anquirinas de 62 proteínas humanas diferentes, usando um método desenvolvido por Anthony-Cahill et al. (1992). O alinhamento mostra a seqüência completa de aminoácidos da p16. Os resíduos em letras pretas são aqueles identificados como parte da seqüência de consenso tipo anquirinas. Acima da seqüência de consenso, observam-se duas hélices previstas, baseadas na conservação da seqüência, hidrofobicidade e periodicidade. Os resíduos hidrofóbicos, altamente conservados, são mostrados em vermelho.<sup>28</sup>

Três mutantes (P48L, D74N e R87L) têm defeito na inibição da quinase e na parada do ciclo celular. Entre as dez mutantes, com ligação normal à CDK e atividade inibitória, três (N71S, R80L e H83Y) têm defeito somente na sua habilidade de induzir a parada do ciclo celular. Então, as proteínas mutantes p16 que mantêm as ligações com CDK4 e CDK6 podem ter outros defeitos funcionais sutis. Todas as nove mutações que levam à incapacidade funcional mapeiam a porção central da proteína p16. As seqüências de aminoácidos II e III (*ankyrin repeats*) parecem ser mais críticas para a função da p16, enquanto as mutações, nas seqüências I e IV, são menos capazes de interromper a função da p16<sup>27</sup>.

Antes das análises que correlacionaram a susceptibilidade ao melanoma, a forma da herança do melanoma familiar não havia sido estabelecida, e os pesquisadores discutiam a possibilidade de um gene responsável. Um local, no cromossomo encarregado dessa

susceptibilidade – CDKN2 (p16, MTS1), foi encontrado, no braço curto do cromossomo 9, como mencionado anteriormente, onde foram detectadas várias deleções, tanto em casos de melanoma como em outros tumores. Entretanto, a demonstração conclusiva do papel desse gene na susceptibilidade ao melanoma tem sido difícil de definir.<sup>4</sup>

Em 2005, Carlson et al. descreveram, baseados nos trabalhos de Hayward e Carlson, mutações com perda de função, no *locus* CD2KA (p16INK/p14ARF), que conferem uma susceptibilidade para o melanoma, e são encontradas em, aproximadamente, 25% das famílias propensas a desenvolver melanoma.<sup>20</sup>

Straume et al., em estudo realizado e publicado em 2000, para investigar se as diferenças de expressão da p16 estão associadas à proliferação celular tumoral, progressão do tumor e sobrevivência do paciente, avaliaram a expressão imunoistoquímica da proteína p16, numa série de 202 melanomas em fase de crescimento vertical e 68 metástases correspondentes, e compararam os resultados com a expressão da Ki-67, p53, variáveis clínico-patológicas e dados de sobrevivência. Dos tumores primários, 45% mostraram ausência ou mínima expressão nuclear para a proteína p16. Esses casos estavam, significativamente, associados com expressão alta do Ki-67 ( $P < 0.0001$ ), ulceração ( $P = 0.0001$ ) e invasão vascular ( $P = 0.03$ ). Concluíram os pesquisadores que a ausência ou a mínima expressão da p16 prediz, de maneira significativa (*log-rank test*,  $P = 0.0003$ ), prognóstico pobre quanto à sobrevida, com 37% e 67% de taxa de sobrevida em dez anos para os casos com ausência ou presença da expressão do p16, respectivamente. Na análise multivariada, a expressão da p16 aparece como um fator prognóstico independente (*hazard ratio* – razão de chance – 2,5; intervalo de confiança de 95%, 1.5 a 4.2;  $P = 0.0008$ ), juntamente com a expressão da p53, da Ki-67, localização anatômica, nível de invasão de Clark e invasão vascular. Os achados desses autores indicaram que a perda da expressão nuclear da proteína p16, nos melanomas em fase de crescimento vertical, está associada à

proliferação celular do tumor (Ki-67) e, independentemente, prediz piora da sobrevida. Mostraram, também, que casos sem a expressão da p53 tinham melhora na sobrevida do paciente.<sup>22</sup>

A revisão, feita por Ortega et al.<sup>29</sup>, mostrou que a rota das ciclinas CDK4/6 – D/INK4 – Rb é uma das mutadas, mais freqüentemente, em câncer humano. Avaliaram a utilização de animais geneticamente modificados (ratos – *knock in e knock out mice*), na detecção do papel dessa rota no controle do crescimento celular, integrando múltiplos estímulos mitogênicos e antimitogênicos. Com relação ao câncer humano, nessa revisão, enfocaram as mutações que, efetivamente, afetaram as atividades das quinases CDK4 e CDK6 ou a sua regulação. A CDK4 está amplificada e superexpressa em grande variedade de tumores (gliomas, sarcomas, tumores da mama e carcinomas da cérvix uterina) e linhagens de células tumorais. O gene CDK6 está amplificado em certos tipos de doenças malignas, incluindo carcinoma de células escamosas, gliomas e tumores linfóides. Translocações cromossômicas também contam para o alto nível de expressão de CDK6 em tumores linfóides. Mutações de ponto nas seqüências de códigos de CDK4 e CDK6 têm sido descritas em tumores humanos e linhagens celulares tumorais, incluindo melanoma e linhagens celulares do neuroblastoma. Essas mutações levam à desregulação das atividades das suas quinases, impedindo a ligação da família de inibidores celulares INK4, sem afetar a afinidade da ciclina CDK4, pela ciclina D1. Provavelmente, nesses pacientes, a atividade da quinase CDK4, embora não aumentada, permanece ativa, por tempo inapropriado, devido à ausência de uma regulação negativa promovida pelos inibidores INK4. A perda da heteroziguidade, em 9p21, ocorre na metade dos tumores da bexiga e em melanomas, e deleções homozigóticas são freqüentes em vários tipos de neoplasias. Embora deleções que levam à perda do p16<sup>INK4a</sup> e p15<sup>INK4b</sup>, assim como do supressor de tumor p14<sup>ARF</sup>, constituam o tipo de mutações mais freqüentes, as mutações de ponto, afetando, exclusivamente, o p16<sup>INK4a</sup>, também ocorrem com freqüência no câncer de pâncreas e no

melanoma. Mais recentemente, tornou-se evidente que os *loci* INK4a-ARF e INK4b participam, freqüentemente, no desenvolvimento do tumor por mecanismos epigenéticos que envolvem perda de expressão devido à hipermetilação do promotor. Por exemplo, p16<sup>INK4a</sup> não é expresso em várias doenças como gliomas, tumores do pulmão ou em tumores da cabeça e pescoço devido à hipermetilação do promotor. Outro evento comum é a perda de um alelo e a metilação de outro. Uma vez que p16<sup>INK4a</sup> e p14<sup>ARF</sup> usam promotores diferentes, estudos de metilação dão informação de acordo com o gene seletivamente silenciado, em cada tipo de tumor.<sup>29</sup>

A importância das alterações na patogênese dos nevos displásicos e melanomas esporádicos permanece controversa. Um estudo realizado para descobrir se as alterações do p16/9p21 ocorrem precocemente em lesões precursoras, assim como as relacionadas ao melanoma esporádico, foi feito utilizando microdissecção do DNA. Utilizaram 44 melanomas cutâneos, 14 nevos displásicos e 6 nevos sem atipia e mediram as alterações do p16, na região 9p21, pela análise da perda da heterozigossidade, como detecção das deleções homozigóticas para o p16 éxon 2. A análise revelou que a perda da heterozigossidade em 9p21, circundando diretamente o p16<sup>INK4a</sup>, ocorreu em, aproximadamente, 40% (17/44) dos melanomas, representando todos os níveis de Clark. A perda da heterozigossidade também foi descoberta em 64% (9/14) dos nevos displásicos e 50% (3/6) dos nevos benignos. Deleção homozigótica do p16 foi encontrada em 29% (4/14) de nevos displásicos, mas nunca em nevos benignos. Esses estudos revelam que a perda da heterozigossidade e deleção homozigótica podem afetar, precocemente, o 9p21 e o local do p16<sup>INK4a</sup>, em lesões conhecidas como precursoras do melanoma, mesmo antes do aparecimento citológico evidente da histologia aberrante. Comparações de alterações em nevos e melanomas, em um mesmo indivíduo, revelaram um padrão de eventos progressivos, mas heterogêneos, sugerindo que processos sistêmicos podem afetar esta região 9p21, em vários momentos, durante a progressão do melanoma.<sup>30</sup>

Bachmann et al. mostraram que os resultados obtidos em seu trabalho parecem confirmar que a rota p16-Rb possui um papel importante na progressão do tumor e no prognóstico de melanomas em fase de crescimento vertical, enquanto alterações na rota p14-p53 parecem ser menos importantes.<sup>31</sup>

Em um estudo baseado na técnica do *tissue microarray*, Alonso et al.<sup>1</sup>, em 2004, utilizaram 39 diferentes anticorpos (para o ciclo celular, apoptose, antígenos de melanoma, fatores de transcrição, reparo de falhas do DNA e outras proteínas) e analisaram 165 amostras de melanoma de 88 pacientes, em diferentes fases de progressão histológica: radial, vertical e metastática. A maioria das alterações encontradas estavam ligadas ao controle do ciclo celular na transição G<sub>1</sub>/S. A ciclina D1 estava expressa em 48% dos casos com expansão radial (12 de 25) e com perda significativa da expressão em 14% dos casos com crescimento vertical (9 de 65), P = 0.002, enquanto a p16 (89% em casos com crescimento vertical *versus* 71% nos metastáticos, P = 0.009) e p27<sup>KIP1</sup> (76% nos radiais *versus* 45% nos casos verticais, P = 0.010) estava diminuída em estágios avançados da doença. Nesse estudo, também fazem uma combinação de marcadores biológicos associados com menor sobrevida global em pacientes em fase de crescimento vertical do melanoma, o que forneceu um modelo preditor com quatro anticorpos: Ki67, p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>CIP1</sup> e Bcl-6. Este modelo preditor foi validado usando uma série independente de 72 pacientes com melanoma em fase de crescimento vertical. Os autores mostram que o uso do *tissue microarray* permitiu a integração não somente da capacidade de detectar múltiplas proteínas em uma série grande de pacientes, mas também o reconhecimento de subpopulações discretas de células, como melanócitos intra-epidérmicos que se constituem no acúmulo celular das fases iniciais da gênese do melanoma maligno. Cada etapa da progressão do melanoma é caracterizada pela expressão de um perfil específico, incluindo: ciclina D1, ciclina A, CDK1, CDK2 e STAT1, na fase de crescimento radial; Ki67, survivina e PKC-B, na fase de crescimento vertical; e ciclina D1, ciclina D3 e

perda da p16, BclII e MUM1, no melanoma metastático. Esse estudo ilustra como as células do melanoma, bem como de outros tumores, progredem ao desregular os mecanismos que controlam a proliferação e evitam a morte celular programada. Curiosamente, a progressão é meticulosamente coreografada, e cada passo é distinguido pela expressão de um grupo característico de proteínas. A maioria das proteínas, encontradas alteradas neste estudo, estavam envolvidas no controle da transição G1/S do ciclo celular, estando, dentre elas, a p16. A perda significativa da expressão da p16, na série desse estudo, está correlacionada com estágios avançados do melanoma (doença metastática). A proteína p16, como já apresentado<sup>21-23,32</sup>, exerce uma função inibitória no ciclo celular, atuando no nível da rota da ciclina D/CDK4-Rb. A inativação do p16<sup>INK4a</sup>, por deleções homozigóticas, deleções de ponto e metilação do promotor, está envolvida na gênese do melanoma familiar e esporádico.<sup>27-30,32,33</sup>

Esse estudo desenvolveu, também, um modelo preditor para sobrevivência, incluindo as proteínas p16, Ki67, p21<sup>CIP1</sup> e Bcl-6. Os dados obtidos do modelo de sobrevivência global identificaram um grupo de pacientes com uma sobrevivência relativamente curta (<6 anos) que parece depender de uma associação entre a ausência da p16 ou a presença da expressão da proteína Bcl-6 em conjunto com alta proliferação (Ki67 > 20) ou com positividade da p21<sup>CIP1</sup>. Concluíram os pesquisadores que a espessura de Breslow e os biomarcadores constituem informações independentes, pois a inclusão do índice de Breslow não produziu nenhuma mudança significativa no modelo preditivo. As séries independentes usadas para validar o modelo confirmaram o valor prognóstico adverso, tanto da perda de expressão da p16 como da aquisição de marcadores do retinoblastoma.<sup>1</sup>

Zhang et al., em 2004, apresentaram um estudo, utilizando o método *Western Blotting*, imunistoquímica e a técnica de PCR, na tentativa de esclarecer a importância das alterações da p16 no melanoma. Examinaram as deleções do p16<sup>INK4a</sup> e a expressão da proteína p16 em

oito linhagens celulares de melanomas primários e metastáticos humanos não selecionados. Melanócitos normais da pele foram usados como controles internos. Detectaram deleções de éxons inteiros do p16<sup>INK4a</sup>, por meio da técnica de PCR. A expressão da proteína p16 foi examinada pelo *Western Blotting* e imunistoquímica. Os resultados mostraram que fragmentos dos éxons 2A, 2C e 3, no gene p16<sup>INK4a</sup>, foram totalmente deletados nas linhas celulares FM28.7 dos melanomas metastáticos, e o fragmento do éxon 3 estava deletado na linha celular FM55M2 de melanoma metastático. A proteína p16 estava fortemente expressa em duas linhas celulares de melanomas primários (FM55P e RaH3), fracamente expressa em uma das linhas celulares de melanoma metastático (FM55M1) e negativa nas outras metástases (FM55M2), quando comparadas às células similares de melanoma primário (FM55P). A proteína p16 estava fortemente expressa em melanócitos da pele normal. A imunistoquímica mostrou que a proteína p16 estava localizada, principalmente, no núcleo das células de melanoma e dos melanócitos normais, quando expressa. Deleções do gene p16<sup>INK4a</sup> foram incomuns, e a perda da expressão da proteína p16 foi um evento comum no melanoma, especialmente, nos estágios mais tardios. A expressão da p16 em melanomas está associada, principalmente, ao grau de invasão e metástases, e não à transformação inicial do tumor. Concluíram que a disfunção da proteína p16 libera sua função inibitória da fosforilação da proteína Rb (retinoblastoma), resultando em um descontrole do crescimento celular e, conseqüentemente, desenvolvimento e progressão tumoral. Sugeriram, também, a hipótese de que a deleção de todos os éxons do gene p16<sup>INK4a</sup> seja um evento incomum no desenvolvimento do melanoma, pois constataram deleção completa dos éxons em apenas duas das cinco linhagens de células de melanoma metastático. Com relação à expressão “proteica”, linhas celulares de melanócitos da pele normal estavam fortemente expressas para a proteína p16, enquanto todas as linhas celulares dos melanomas metastáticos apresentavam perda parcial ou total da expressão da proteína p16, indicando que a perda da expressão dessa

proteína é freqüente na progressão do melanoma.<sup>32</sup>

A expressão da p16 em melanomas primários está associada ao prognóstico e à condição linfonodal, segundo demonstraram Mihic-Probst et al.<sup>34</sup> O estado linfonodal é um importante fator prognóstico em pacientes com melanoma. A expressão da p16 e a taxa de proliferação (MIB-1) de melanomas primários têm sido sugeridas como marcadores de potencial metastático. Neste estudo, a correlação da expressão da p16 e a taxa de proliferação (MIB-1), com a condição linfonodal e a sobrevivência tumor-específica, foram investigadas nos melanomas primários. Analisaram, por meio da imunistoquímica, a expressão da p16 e da MIB-1 em 64 pacientes com melanoma cutâneo primário. Trinta e quatro nevos foram usados como controle. Todos os pacientes foram submetidos ao estadiamento do linfonodo sentinela (LNS). Três padrões de coloração da p16 foram observados: uma combinação de coloração nuclear e citoplasmática, somente citoplasmática e ausência de expressão da p16. Todos os 34 nevos mostraram coloração da p16 tanto nuclear como citoplasmática, enquanto a expressão da p16 era negativa em 14 de 64 (22%) melanomas. O nível de expressão da p16 diminuía, gradativamente, do nevo benigno para o melanoma sem metástase, e para o melanoma com metástase. Houve uma correlação significativa entre a expressão citoplasmática da p16 e a ausência de metástase ( $p < 0.05$ ). Morte pela doença estava correlacionada com a ausência da imunocoloração ( $P = 0.01$ ). A expressão da MIB-1 não estava associada à sobrevivência. Esses estudos confirmam a relevância da expressão da p16 como marcador prognóstico em pacientes com melanoma. Também foi demonstrado que a imunocoloração citoplasmática da p16, em melanomas primários, poderá servir como preditor da condição linfonodal. Portanto, concluíram que a avaliação da expressão da p16 é de grande valor no planejamento cirúrgico do melanoma.<sup>34</sup>

Fearfield et al.<sup>33</sup>, em trabalho realizado em março de 2007, informaram ser este o primeiro a demonstrar a perda significativa da expressão da p16 em melanomas muito finos,



recidivados. Mostraram, claramente, que a perda de expressão da proteína p16 está relacionada a um pior prognóstico para os pacientes. Embora a grande maioria dos pacientes com melanomas finos (<0,76 mm) obtenha a cura com a ressecção cirúrgica da lesão, 2 a 18% desses pacientes apresentam recidiva da doença. O objetivo desse estudo foi, exatamente, estabelecer o potencial de novos marcadores de prognóstico em melanomas muito finos. Salientaram que esse é o primeiro trabalho a mostrar uma significativa perda da p16 em melanomas muito finos que apresentaram recidiva.

Estudos imunoistoquímicos têm mostrado a correlação entre a perda da expressão da proteína p16 e progressão do melanoma<sup>2,22,32,34</sup>, embora nunca tenha sido, especificamente, investigada em melanomas muito finos. A imunocoloração das secções foi medida de três maneiras: imuno-reatividade (p16, CD95 e CD95L), percentagem de células positivas ou núcleos (HPA\* e p16, respectivamente) e índice de coloração (p16), por meio da imunoistoquímica. Inicialmente, selecionaram 45 casos de melanoma muito finos com recorrência, e 48 controles com melanomas cutâneos muito finos sem recidiva. Vinte e cinco casos e 15 controles foram eliminados do estudo após revisão clínico-patológica.

A imunocoloração para p16 foi realizada em cortes de 18 casos e suas 17 subseqüentes metástases e 28 controles. Comparando casos e controles, com relação à imunoistoquímica para a p16, os autores descreveram uma mediana do índice de coloração de 2 (IIQ- Intervalo interquartil: 2-4) para os casos, e uma mediana de 4 (IIQ: 2-6) para os controles e um valor P = 0.03. Comparando os casos com as metástases, a mediana do índice de coloração foi de 0 (zero) para as metástases (IIQ: 0-2; IC 95%) e um valor P < 0.001. Ainda, somente 22% dos cortes de melanomas primários tinham índice de coloração 0 (zero), em comparação com 76% das metástases. Esses resultados mostraram, em todos os sistemas de escores empregados, uma significativa redução da imunocoloração da p16 em melanomas muito finos, nos casos

---

\* HPA – *Helix pomatia agglutinin*.

que apresentaram recidiva, quando comparados com os controles (sem retorno da doença). Perda mais significativa da expressão da p16 foi vista nas metástases, comparativamente aos tumores primários. Há, nessa pesquisa, uma autocrítica dos autores com relação à limitação do estudo em função do pequeno número de casos incluídos, e ao fato de ter sido uma análise retrospectiva, embora os dados tenham sido mantidos prospectivamente. Salientam que, por ser um estudo pequeno, mesmo diferenças maiores entre casos e controles não atingiriam significância estatística. Como a recidiva de melanomas muito finos é extremamente rara, também o número de casos seria, inevitavelmente, pequeno.

## 2.6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Com o avanço no conhecimento da patogênese do melanoma, pela oncologia molecular, novos marcadores, mais específicos, poderão surgir para auxiliar o diagnóstico, prognóstico e tratamento dessa doença.

Até o surgimento de novos marcadores que possibilitem melhor orientar quanto à progressão e/ou prognóstico de um paciente com um determinado melanoma cutâneo, a proteína p16 parece ser um interessante marcador que, além de sugerir uma maior agressividade de um tumor sobre outro, por sua expressão, poderá auxiliar na conduta terapêutica.

De acordo com os trabalhos de vários autores<sup>1,2,22,32,34</sup>, a evidência de uma expressão forte da proteína p16 em nevos benignos e melanomas finos, contrastando com a expressão moderada em melanomas com crescimento vertical e/ou metástases regionais, e a ausência de expressão em melanomas com metástases a distância, mostra a progressão da doença, à medida que se perde a expressão da proteína p16.

Straume et al.<sup>22</sup>, em sua série de 202 casos de tumores primários, em fase crescimento vertical, e 68 metástases correspondentes, mostraram que coloração nuclear mínima ou ausente é preditora para sobrevida livre de doença, com 37% e 67% de sobrevida estimada para dez anos para casos com ausência ou presença da expressão da p16, respectivamente.

As técnicas de *microarray* e *tissue array*<sup>1</sup> têm sido úteis tanto na determinação de seqüenciamento genético, reconhecendo mutações, como na identificação de diferentes expressões de marcadores (proteínas), relacionando-os com a evolução do melanoma. Provavelmente, em um futuro muito próximo, com a redução de custos do método, ele poderá se tornar muito útil não só na identificação individualizada de casos com maior potencial agressivo, mas na indicação sobre o melhor caminho

Assim, mesmo em casos em que a técnica do LNS tenha mostrado ausência de micrometástases, uma expressão fraca ou ausente na imunistoquímica para a proteína p16 poderá indicar uma mudança na conduta terapêutica ou uma busca mais minuciosa de possíveis metástases em outros sítios (*skipping* metástases).terapêutico a ser seguido para cada paciente.

Os estudos imunológicos que procuram desvendar a existência de imunossupressão no LNS poderão ser, também, um caminho importante na elucidação do comportamento evolutivo do melanoma, isto é, mostrar a rota das metástases e os mecanismos pelos quais eles progridem.<sup>17,18</sup>

A evolução da oncologia molecular, nos próximos anos, certamente, identificará outros genes e/ou proteínas envolvidos na origem, crescimento e progressão do melanoma. Como consequência, haverá novas armas de terapia gênica que permitirão manter um controle sobre o crescimento e evitar a disseminação metastática ou, mesmo, o surgimento desta grave doença – o melanoma.

## 2.7 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

- 1 Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L, Acuña MJ, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles. *Am J Pathol*, 2004; 164(1):193-203.
- 2 Ministério da Saúde do Brasil – INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>> <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=335](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335)> Acesso: 17.Julho.2008
- 3 Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 2004;150(2):179-85.
- 4 Skolnick MH, Cannon-Albright LA, Kamb A. Genetic predisposition to melanoma. *Eur J Cancer*, 1994;30A(13):1991-5.
- 5 Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988;124:869-71.
- 6 Barnhill RL. Criteria for diagnosis and classification of melanoma. In: Barnhill RL, editor. *Pathology of malignant melanoma*. New York: Springer-Verlag; Dec 2003. p. 2-17.
- 7 Clark WH Jr. A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biologic behavior. In: Montagna W, Hu F, editors. *Advances in the Biology of the Skin*. New York: Pergamon, 1967;8:621-47.
- 8 Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969;29:705-27.
- 9 Cotran R, Kumar V, Collins. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. In: Murphy GF, Mihn MC Jr., editors. *The Skin*. 6th ed. Philadelphia, USA: WB Saunders Company; 1999. p. 1178.
- 10 National Cancer Institute – Melanoma 208/01302. National Cancer Institute p.1-15. Disponível em: <<http://cancerweb.ncl.ac.uk/cancernet/101302.html>> Acesso: 20.Mar.2008.
- 11 Essner R. Sentinel lymph node biopsy and melanoma biology. *Clin Cancer Res* 2006 April 1;12(7Suppl):2320s-5s.
- 12 Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer* 1977 Feb;39(2):456-66.
- 13 Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*. 1992 Apr; 127(4):392-9.

- 14 Essner R, Bostick PJ, Glass EC, Foshag LJ, Haigh PI, Wang HJ, et al. Standardized probe-direct sentinel node dissection in melanoma. *Surgery* 2000; 127: 26-31.
- 15 Fonseca LMB. Linfonodo Sentinela. *Radiol Bras*, vol.35 n. 5 – São Paulo Sept/Oct 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010039842002000500001&script=sci\\_arttext&tlng=in](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010039842002000500001&script=sci_arttext&tlng=in)>. Acesso: 15.Jul.2008.
- 16 McMasters KM, Noyes RD, Reintgen DS, Goydon JS, Beitsch PD, Davidson BS, et al. Lessons learned from the Sunbelt Melanoma Trial. *J. Surg Oncol* 2004;86:212-23.
- 17 Cochran AJ, Morton DL, Stern S, Lana AMA, Essner R, Wen DR, et al. Sentinel lymph nodes show profound down-regulation of antigen presenting cells of the paracortex : implications for tumor biology and treatment. *Mod Pathol* 2001;16:604-8.
- 18 Alitalo K, Mohia S, Ruosiahti E. Lymphangiogenesis and cancer: meeting report. *Cancer Res* 2004;64:9225-9.
- 19 Torabian S, Kashani-Sabet M. Biomarkers for Melanoma. *Curr Opin Oncol* 2005,17:167-71.
- 20 Carlson JA, Ross JS, Slominski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, et al. Molecular diagnostics in melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2005 May; 52(5):743-75.
- 21 Straume O, Smeds J, Kumar R, Hemminki K, Akslen LA. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *Am J Pathol*, 2002 July; 161(1):229-37.
- 22 Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res* 2000 May; 6:1845-53.
- 23 Hong SM, Choi J, Ryu K, Ro JY, Yu E. Promoter hypermethylation of the p16 gene and loss of its protein expression is correlated with tumor progression in extrahepatic bile duct carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2006 Jan; 130(1):33-8.
- 24 Genes and Diseases. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/gnd/ch17d1.pdf>> Acesso em: 25.Jul.2008.
- 25 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control, causing specific inhibition of cyclin D/CDK3. *Nature* 1993 Dec; 366:704-7.
- 26 McConnel BB, Gregory FJ, Stott FJ, Hara E, Peters G. Induced expression of p16<sup>INK4a</sup> inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassembly of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Mol Cell Biol*, 1999 Mar; 19(3):1981-9.
- 27 Wendell G, Yarbrough WG, Buckmire RA, Bessho M, Liu ET. Biologic and biochemical analyses of p16<sup>INK4a</sup> mutations from primary tumors. *J Natl Cancer Inst* 1999 Sep 15;91(18):1569-74.
- 28 Boice JA, Fairman R. Structural characterization of the tumor suppressor p16, an ankyrin-like repeat protein. *Protein Sci.* 1996;5:1776-84.

- 29 Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602:73-87.
- 30 Tran TP, Titus-Ernstoff L, Perry AE, Ernstoff MS, Newsham IF. Alteration of chromosome 9p21 and/or p16 in benign and dysplastic nevi suggests a role in early melanoma progression. *Cancer Causes Control* 2002;13:675-82.
- 31 Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Altered expression of cell cycle regulators Cyclin D1, p14, p16, CDK4 and Rb in nodular melanomas. *Int J Oncol* 2004;25:1559-65.
- 32 Zhang H, Rosdahl I. Deletion in p16<sup>INK4a</sup> and loss of p16 expression in human skin primary and metastatic melanoma cells. *Intern J Oncol* 2004;24:331-5.
- 33 Fearfield LA, Larkin JM, Rowe A, A'Hern R, Fisher C, Francis N, et al. Expression of p16, CD95, CD95L and Helix pomatia agglutinin in relapsing and nonrelapsing very thin melanoma. *Br J Dermatol* 2007 Mar; 156(3):440-7.
- 34 Mihic-Probst D, Mnich CD, Oberholzer PA, Seifert B, Sasse B, Moch H, et al. p16 expression in primary malignant melanoma is associated with prognosis and lymph node status. *Int J Cancer* 2006 May 1;118(9):2262-8.

### 3 ARTIGO ORIGINAL

## AUSÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO ENTRE MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS E A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p16

Fauri JAC<sup>1</sup>; Ricardi F<sup>2</sup>; Diehl ES<sup>3</sup>; Cartell A<sup>4</sup>; Furian R<sup>5</sup>; Bakos L<sup>6</sup>; Edelweiss MIA<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup> Mestre em Patologia, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA), Brasil.

<sup>3</sup> Mestre em Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

<sup>4</sup> Professor auxiliar, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

<sup>5</sup> Professor assistente, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

<sup>6</sup> Professor titular de Dermatologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

<sup>7</sup> Professora associada, Departamento de Patologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

#### Endereço para correspondência:

JORGE ANTÔNIO CALEFFI FAURI  
Av. Maryland, 1367 ap. 902  
CEP:90.440-191 - Porto Alegre - RS.  
Telefone: 3332.0339  
e-mail: fauri47@gmail.com

### 3.1 RESUMO

**Introdução:** A invasão dérmica pelo melanoma cutâneo, mensurada pela espessura tumoral máxima, ou índice de Breslow, assim como a pesquisa do linfonodo sentinela (LNS), são fatores importantes para o prognóstico e evolução dessa doença. A utilização da expressão da proteína p16, como fator preditivo para a evolução ou prognóstico do melanoma, é tema de vários artigos científicos. Chana demonstrou expressão forte da proteína p16 em nevos melanocíticos, níveis mais baixos de expressão em nevos melanocíticos displásicos e progressivamente menores em melanomas cutâneos e metastáticos.

**Objetivo:** verificar a expressão da proteína p16 nos melanomas cutâneos, com e sem metástase em LNS.

**Material e métodos:** Avaliaram-se 67 amostras de melanoma cutâneo, de 67 pacientes que foram submetidos à pesquisa do LNS, entre 1996 e 2007. Em 34 desses pacientes, o LNS foi negativo para metástases (controles). Nos demais (n=33), foi positivo (casos). Verificou-se a expressão da p16 no tumor primário pela imunohistoquímica. As amostras foram classificadas, segundo sua expressão nuclear.

**Resultados:** A expressão nuclear da p16 mostrou-se ausente em 14 (42,4%) casos e em 15 (44,1%) controles;  $P=0,812$ . Não houve significância estatística para a expressão nuclear da p16, entre casos e controles.

**Conclusões:** Este estudo não confirma o papel da proteína p16 como importante na avaliação prognóstica do melanoma cutâneo, embora muitos autores mostrem que, associada ao índice de Breslow, pode fornecer previsão mais acurada sobre a existência, ou não, de metástases linfonodais. Há necessidade de padronização dos protocolos de atendimento a pacientes com melanoma cutâneo, em nosso estado.

**Palavras-chave:** melanoma, p16, imunohistoquímica, linfonodo sentinela, metástases.



### 3.2 INTRODUÇÃO

O aumento da incidência do melanoma cutâneo, de 3 a 7% em caucasianos,<sup>1</sup> preocupa os órgãos de saúde em todo o mundo. A busca de marcadores, que possam predizer, com acurácia, a possibilidade de um determinado melanoma cutâneo produzir metástases tem sido o foco de inúmeras pesquisas.<sup>2-6</sup> Com as descobertas realizadas no campo da biologia e oncologia moleculares, muitas ligações entre genes e desenvolvimento de tumores foram esclarecidas.

A pesquisa do linfonodo sentinela (LNS), em melanomas cutâneos, descrita por Morton et al.,<sup>7</sup> mudou a conduta na abordagem cirúrgica em centros especializados de tratamento desses tumores, em todo o mundo. A utilização de um marcador histológico específico e sensível poderia colaborar na seleção dos pacientes candidatos à pesquisa do LNS.

Chana et al.<sup>8</sup> demonstraram altos níveis de expressão da proteína p16 em nevos melanocíticos, com níveis mais baixos de expressão em nevos melanocíticos displásicos. Níveis, progressivamente mais baixos, foram demonstrados em melanomas cutâneos primários e metastáticos. Os mesmos autores<sup>9</sup>, estudando melanomas do subtipo acral lentiginoso, investigaram o embasamento biológico-molecular e celular desses tumores e sugeriram que a perda da expressão da p16 está associada não só com a transformação precoce de lesões benignas, mas com a progressão da doença, em seu estágio invasivo.

O gene p16<sup>INK4a</sup> foi identificado como alvo para mutações em vários tipos de tumores, além do melanoma cutâneo. Ele codifica a proteína 16kDA que inibe as enzimas dependentes de quinases CDK4 e CDK6. Essas quinases, por sua vez, fosforilam a proteína Rb (retinoblastoma), no *checkpoint* G<sub>1</sub> do ciclo celular. A forma hipofosforilada da proteína Rb

previne a entrada na fase S (ou de síntese) do ciclo celular, ao seqüestrar uma família de fatores de transcrição, como o E2F, necessária para a replicação do DNA e progressão do ciclo celular. Na falta da proteína p16, ocorre a fosforilação da proteína Rb pelas CDK4 e CDK6, liberando esses fatores de transcrição e levando à replicação do DNA, com conseqüente proliferação tumoral.<sup>9</sup>

Hipótese: a expressão fraca ou ausente da proteína p16 em melanomas cutâneos primários está associada a pior prognóstico.

No presente estudo, verificou-se a expressão imunoistoquímica da proteína p16 em melanomas cutâneos primários, a partir de biópsias processadas para exame anatomopatológico, oriundas de pacientes que, posteriormente, se submeteram à pesquisa do linfonodo sentinela, conforme protocolo do serviço de cirurgia oncológica. Correlacionou-se a expressão da proteína p16 com os diferentes graus histológicos da progressão dos melanomas.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento utilizado foi de um estudo observacional de caso-controle, realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O fator em estudo foi a expressão imunoistoquímica da proteína p16 em melanomas cutâneos primários; o desfecho, a presença ou ausência de metástase em linfonodo LNS.

As variáveis independentes foram: sexo, idade, localização do tumor primário, tipo histológico, índice de Breslow, nível de Clark.

Critério de inclusão: pacientes com o diagnóstico de melanoma cutâneo operados nos serviços acima mencionados e submetidos à pesquisa do linfonodo sentinela.

Critérios de exclusão: quimioterapia prévia; história ou presença de outra neoplasia maligna concomitante, exceto as da pele; imunossupressão; ausência ou escassez de material da lesão primária no bloco de parafina, pacientes com prontuários incompletos e pacientes com metástases de melanoma a distância.

Foram selecionados 316 casos de melanoma cutâneo primário a partir dos laudos anatomopatológicos dos serviços de patologia do HCPA e Santa Casa de Porto Alegre, abrangendo o período de 1995 a 2007. Destes, 163 (51,58%) possuíam apenas a descrição da lesão primária, sem referência à pesquisa do LNS e foram excluídos do estudo. Faziam parte desse grupo 21 melanomas *in situ*, 10 amostras obtidas por *punch*, 2 melanomas amelanóticos, 1 melanoma múltiplo, 1 amostra com material insuficiente e 1 melanoma não classificável. Dos 153 (48,42%) casos restantes, em 12 casos havia apenas referência ao LNS, em 16 os prontuários dos pacientes estavam incompletos, 1 era melanoma de mucosa apenas, 1 recidivado e 56 eram metastáticos. Esses também foram excluídos do estudo. Restaram 67 (21,20%) amostras de melanoma cutâneo, incluídas em blocos de parafina e obtidas de 67 pacientes com prontuários completos que, em sua avaliação clínica, foram submetidos à pesquisa do linfonodo sentinela. Em 34 desses pacientes, o linfonodo sentinela foi negativo para metástases (controles); nos demais (n=33), o linfonodo sentinela foi positivo (casos).

### 3.4 PLANEJAMENTO DA ANÁLISE

#### 3.4.1 Imunoistoquímica

Os cortes de biópsias (representativas da lesão, com 3 µm de espessura), fixados em formalina e incluídos em parafina, foram submetidos à técnica de imunoistoquímica

empregada na rotina do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rio Grande do Sul, Brasil, descrito por Mills<sup>10</sup>, em 1992, e Santos et al.<sup>11</sup>, em 1999. A técnica compreende as seguintes etapas: desparafinização e reidratação, recuperação antigênica, inativação da peroxidase endógena e bloqueio de reações inespecíficas. O anticorpo primário – *monoclonal mouse anti human IgG p16<sup>INK4a</sup>*, DAKO - foi incubado por 12 horas (*overnight*) a 4°C, na diluição de 1:50, seguido da aplicação do complexo-estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako), revelação com tetrahydroclorido de diaminobenzidina (Kit DAB, Dako) e contrastado com a coloração de *Giemsa*.

Para a detecção da proteína p16, foi utilizada, como controle positivo da reação, lâmina corada com lesão intraepitelial de alto grau do colo uterino; como controle negativo, lâmina sem o anticorpo primário. As células estromais não neoplásicas, com reatividade nuclear e linfócitos, foram utilizadas como controle interno positivo.

A utilização da coloração de *Giemsa* visou a neutralizar e diferenciar a coloração (real) da técnica imunoistoquímica (marrom pelo DAB) com a pigmentação amarronzada melânica da lesão, que se torna azulada forte com essa contracoloração.

Dois patologistas foram cegados para as informações histopatológicas e clínicas, para a leitura e estratificação da intensidade da expressão da oncoproteína p16, nas lâminas. O resultado final foi obtido pelo consenso entre os dois profissionais.

### **3.4.2 Interpretação da p16**

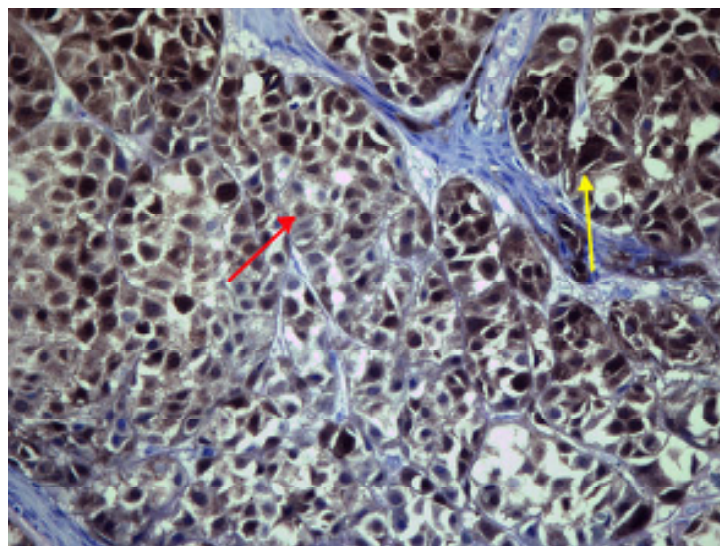
A intensidade de expressão nuclear da proteína p16 foi estratificada em quatro níveis: ausente, fraca, moderada e forte. Avaliando dez campos de grande aumento (cada campo definido como quatrocentos aumentos), conforme realizado por Schneider-Stock et al.<sup>12</sup>, um

corte foi considerado imunistoquimicamente positivo para p16, quando o núcleo das células tumorais estava corado (com ou sem expressão citoplasmática) e foi classificado em uma escala semiquantitativa de 0 a 3 pontos (Tabela 1).

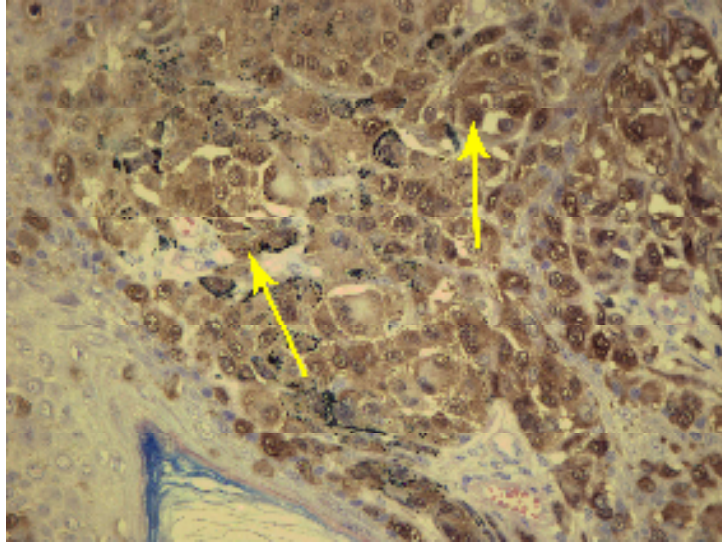
**Tabela 1.** Escala semiquantitativa de coloração nuclear, segundo Schneider-Stock et al.<sup>12</sup>

Expressão nuclear	Percentual de núcleos corados	Escala de pontos
Ausente	0 a 5%	0
Fraca	6 a 20%	1
Moderada	21 a 50%	2
Forte	mais de 50%	3

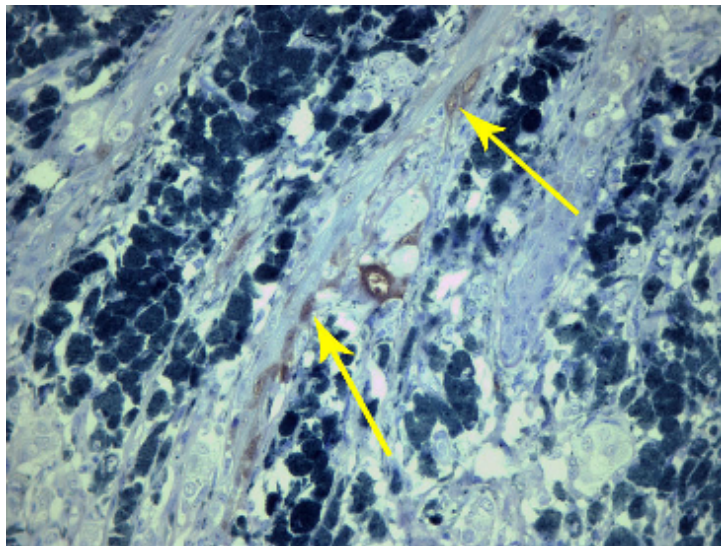
As Figuras 1 a 4 mostram imagens de reações de expressão nuclear, nos casos estudados, exemplificando os critérios utilizados para sua classificação.



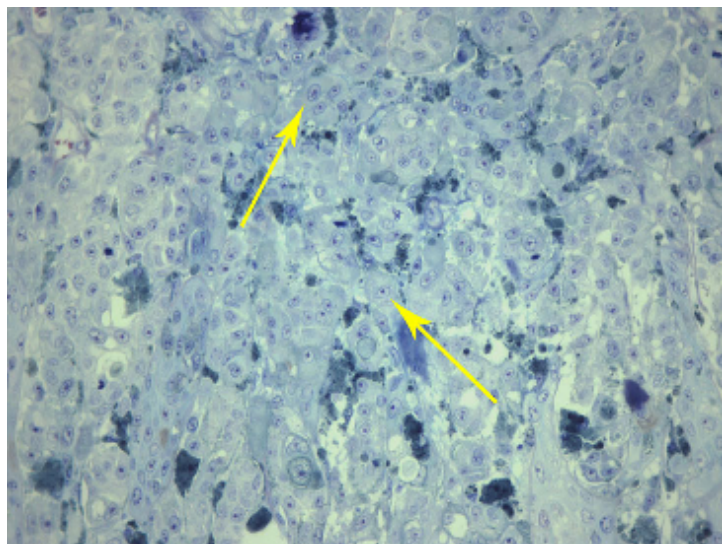
**Figura 1. Expressão forte.** Imagem digital de melanoma cutâneo com expressão nuclear forte (seta amarela) e moderada (seta vermelha) da proteína p16. Notar coloração citoplasmática fraca, não avaliada no estudo. (p16, imunistoquímica, ampliação de 400x no original).



**Figura 2. Expressão moderada.** Imagem digital de melanoma cutâneo, ressaltando alguns núcleos com expressão moderada da proteína p16 (seta amarela). (p16, coloração imunoistoquímica, ampliação de 400x, no original.



**Figura 3. Expressão fraca.** Imagem digital de melanoma cutâneo, com expressão nuclear fraca, da proteína p16. Áreas com núcleos muito pouco corados (seta amarela). (p16, coloração imunoistoquímica, ampliação de 400x, no original.



**Figura 4. Expressão ausente.** Imagem digital de melanoma cutâneo, com ausência de expressão nuclear da proteína p16. Áreas azuis mostram (seta amarela) reação de melanina com a contracoloração de Giemsa (p16 coloração imunohistoquímica, ampliação de 400x, no original).

### 3.4.3 Interpretação anatomopatológica

A caracterização morfológica das lâminas foi realizada por dois patologistas. O resultado do estudo anatomopatológico, dos casos e controles, foi categorizado e analisado nos vários subtipos do melanoma cutâneo, conforme a classificação histogenética de Clark: Acral-lentiginoso, Espalhamento superficial, Nodular e Lentigo maligno-melanoma.<sup>13</sup> Os critérios histopatológicos de progressão das lesões – nível de Clark<sup>13</sup> e índice de Breslow<sup>14</sup> – também foram revisados.

Todos os casos foram avaliados, do ponto de vista clínico e anatomopatológico, quanto à presença ou ausência de metástase no linfonodo sentinela, pela revisão dos laudos dos exames histopatológicos.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados, foi utilizado o programa SPSS for Windows®, versão 13.0. A análise descritiva foi realizada por meio de frequências absolutas e relativas. Para a comparação das características demográficas, clínicas e histopatológicas, entre casos e controles, foram utilizados os testes de qui-quadrado de Pearson, exato de Fisher e t de Student. O nível de significância considerado foi de 0,05.

Cálculo da amostra: Considerando que em LNS positivo a média da expressão da proteína p16 é, aproximadamente, 1,5 com desvio-padrão (DP) $\pm$ 1, e que em LNS negativo a média da expressão da proteína p16 é de, aproximadamente, 2,3 com DP $\pm$ 1, calculou-se o tamanho da amostra em 60 casos, para um intervalo de confiança de 95% e poder de 80%.

A microespessura tumoral máxima da lesão ou índice de Breslow<sup>14</sup> foi correlacionada com a maior ou menor expressão da p16, utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson (r). Igualmente, o tipo histológico e localização do tumor foram comparados com esses graus de expressão.

### 3.6 ASPECTOS ÉTICOS

A permissão para o uso de todo o material biológico utilizado nesta pesquisa foi dada pelos comitês de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) - Processo nº 06/072, e da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, conforme parecer consubstanciado nº 316/07. O material foi obtido de exames de pacientes cujas biópsias haviam sido realizadas pelo grupo de cirurgia e dermatologia dos dois hospitais e estavam arquivados em blocos de parafina, nos dois serviços de patologia cirúrgica.



### 3.7 RESULTADOS

Foram estudados 33 casos com metástase em LNS, e 34 controles, sem metástase em LNS. Entre os casos, havia 13 (39,4%) pacientes do sexo feminino e 20 (60,6%) do sexo masculino. Entre os controles, 25 (73,5%) do sexo feminino, e 9 (26,5%) do sexo masculino;  $P=0,010$ . A idade média dos pacientes com LNS positivo (casos) foi de  $54 \pm 14$  anos. Nos controles (LNS negativo), a idade média foi de  $53 \pm 13$  anos;  $P=0,662$ . O local anatômico mais freqüente para surgimento do tumor foi o dorso: 10 (30,3%) casos e 8 (25,8%) controles;  $P=0,156$  (Tabela 2).

**Tabela 2.** Características demográficas da população estudada com melanoma cutâneo (n=67).

Variável	Categoria	Caso (n=33)	Controle (n=34)	p-valor
Sexo	Feminino	13 (39,4)	25 (73,5)	0,010*
	Masculino	20 (60,6)	9 (26,5)	
Idade		$54 \pm 14$	$53 \pm 13$	0,662***
Localização	Dorso	10 (30,3)	8 (25,8)	0,156**
	Pé	7 (21,2)	4 (12,9)	
	Membro inferior, exceto pé	5 (15,2)	8 (25,8)	
	Couro cabeludo/pescoço	3 (9,1)	0 (0)	
	Tórax	3 (9,1)	0 (0)	
	Membro superior	2 (6,1)	7 (22,6)	
	Face	2 (6,1)	2 (6,5)	
	Abdômen	1 (3)	2 (6,5)	

Nota: \*Teste qui-quadrado. Valores expressos como freqüências absolutas (relativas).

\*\* Teste exato de Fisher. Valores expressos como freqüências absolutas (relativas).

\*\*\* Teste t de Student. Valores expressos em média  $\pm$  desvio-padrão

Quanto ao tipo histológico do tumor, houve predominância do tipo espalhamento superficial: 22 (66,7%) casos e 25 (78,1%) controles (Tabela 3).

**Tabela 3.** Distribuição de frequências, conforme o tipo histológico de melanoma cutâneo

Melanoma subtipo	N	LNS+ (Casos)	LNS – (Controles)	p-valor
Espalhamento sup	47	22 (66,7)	25 (73,5)	0,653**
Acral	10	6 (18,2)	4 (11,8)	
Nodular	6	4 (12,1)	2 (5,9)	
Lentigo maligno-melanoma	1	0 (0)	1 (2,9)	
Não classificável	3	1 (3)	2 (5,9)	
Total	67	33	34	

Nota: \*\* Teste exato de Fisher. Valores expressos como frequências absolutas (relativas).

LNS+: Linfonodo Sentinela Positivo; LNS: Linfonodo Sentinela Negativo; n= nº de pacientes.

Pela classificação, conforme o índice de Breslow, a maioria dos tumores apresentavam espessura entre 1,01 e 4,00 mm: 20 (60,6%) casos e 21 (61,8%) controles; P=0,003. Os níveis de Clark III e IV estavam presentes na grande maioria dos tumores. Clark III: 4 (12,1%) casos e 10 (29,4%) controles. Clark IV: 23 (69,7%) casos e 23 (67,6%) controles; P= 0,080. (Tabela 4).

**Tabela 4.** Espessura do tumor (Breslow) e níveis de Clark, dos melanomas cutâneos, em casos e controles.

Variável	Categoria	Caso (n=33)	Controle (n=34)	P-valor
Breslow	Até 0,75	1 (3)	5 (14,7)	0,003**
	0,76 a 1,00	2 (6,1)	7 (20,6)	
	1,01 a 4,00	20 (60,6)	21 (61,8)	
	4,01 ou mais	10 (30,3)	1 (2,9)	
Clark	2	1 (3)	0 (0)	0,080**
	3	4 (12,1)	10 (29,4)	
	4	23 (69,7)	23 (67,6)	
	5	5 (15,2)	1 (2,9)	

Nota: \*\* Teste exato de Fisher. Valores expressos como frequências absolutas (relativas).

Considerando a intensidade da expressão da proteína p16,<sup>12</sup> verificou-se que estava ausente em 14 (42,4%) casos e em 15 (44,1%) controles; fraca em 03 (9,1%) casos e em 03

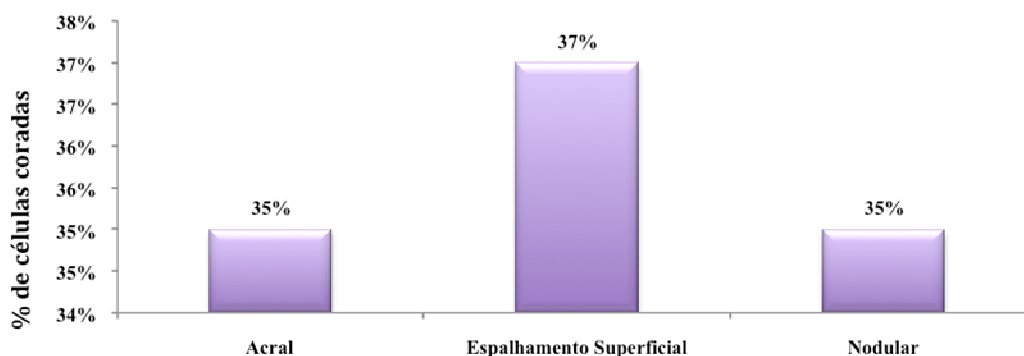
(8,8%) controles, OR: 1,07 (0,14-8,34), IC 95%; moderada em 03 (9,1%) casos e em 01 (2,9%) controle, OR: 3,21 (0,24-90,82), IC 95%; e forte em 13 (39,4%) casos e em 15 (44,1%) controles, OR: 0,93 (0,29-2,99), IC 95%. (P=0,812) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Expressão da p16, conforme intensidade de expressão, em casos e controles<sup>12</sup>

Variável	Categoria	Caso (n=33)	Controle (n=34)	P-valor	OR (IC 95%)
Expressão	Ausente	14 (42,4)	15 (44,1)	0,812**	1
	Fraca	3 (9,1)	3 (8,8)		1,07 (0,14 – 8,34)
	Moderada	3 (9,1)	1 (2,9)		3,21 (0,24 – 90,82)
	Forte	13(39,4)	15 (44,1)		0,93 (0,29 – 2,99)

Nota: \*\* Teste exato de Fisher. Valores expressos como freqüências absolutas (relativas).

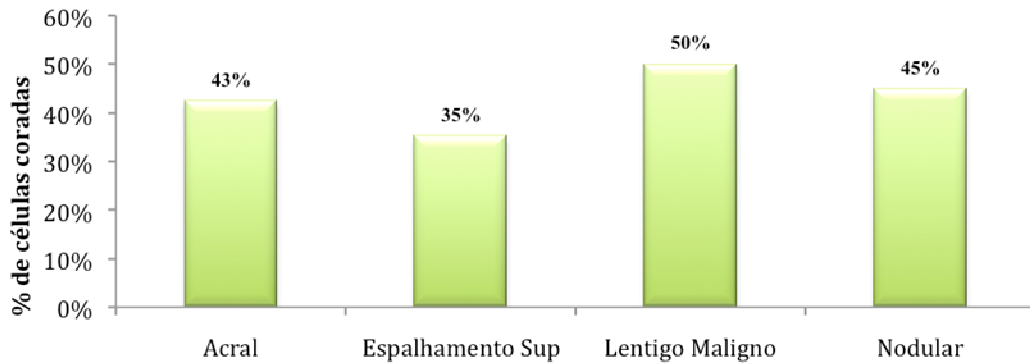
Comparando a expressão da proteína p16 (percentual de núcleos corados) com o tipo histológico do tumor, nos casos, obteve-se como média de percentual de núcleos corados: melanoma acral 35% (DP±0,40); espalhamento superficial, 37% (DP±0,39); e nodular, 35% (DP±0,34) (Gráfico 1).



**Gráfico 1.** Médias de percentual de núcleos corados, por tipo histológico de melanoma cutâneo, nos casos.

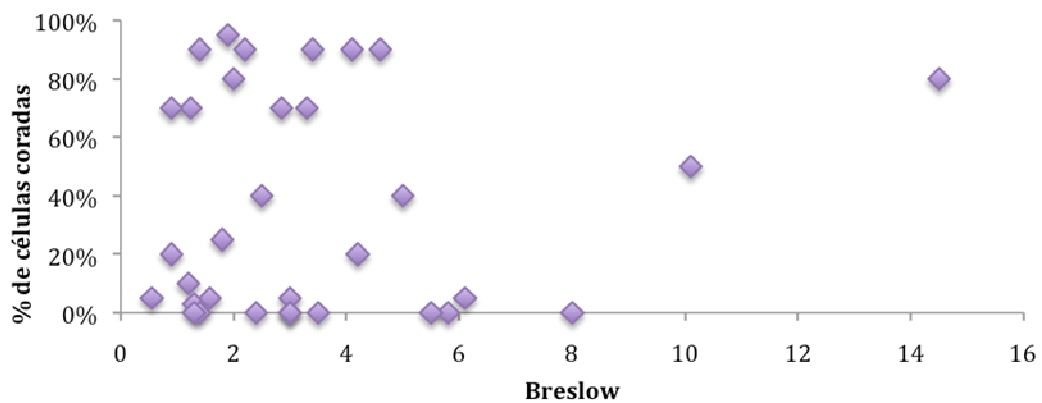
Comparando a expressão da proteína p16 (percentual de núcleos corados) com o tipo histológico do tumor, nos controles, obteve-se como média de percentual de núcleos corados:

melanoma acral 43% (DP± 0,38); espalhamento superficial, 35% (DP± 0,40); lentigo maligno-melanoma, 50% e nodular, 45% (DP± 0,49) (Gráfico 2).



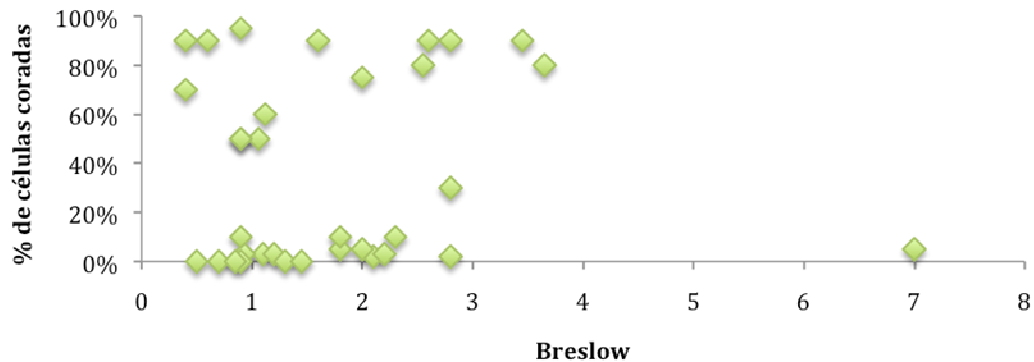
**Gráfico 2.** Médias de percentual de núcleos corados, por tipo histológico de melanoma cutâneo, nos controles.

Comparando a espessura máxima do tumor (índice de Breslow) com o percentual de núcleos corados, nos casos (expressão), não se obteve correlação entre o índice de Breslow e positividade da proteína p16 (percentual de núcleos corados),  $r=0,029$ ;  $p=0,873$  (Gráfico 3).



**Gráfico 3.** Distribuição do percentual de núcleos corados, em relação à espessura do tumor, nos casos.

Comparando a espessura máxima do tumor (índice de Breslow) com o percentual de núcleos corados nos controles (expressão), não se obteve correlação entre o índice de Breslow e positividade da proteína p16 (percentual de núcleos corados),  $r=0,146$ ;  $p=0,410$  (Gráfico 4).



**Gráfico 4.** Distribuição do percentual de núcleos corados, em relação à espessura do tumor, nos controles.

### 3.8 DISCUSSÃO

Neste estudo, verificou-se a expressão da proteína p16 em melanomas cutâneos primários, com e sem metástase, em linfonodo sentinela (LNS).

No melanoma cutâneo, muitos trabalhos analisaram a utilização da proteína p16 (inibidora das quinases dependentes de ciclina – CDK4/6-ciclina D, que inibe a proteína do retinoblastoma-Rb).<sup>2-6</sup>

Um dos aspectos mais importantes é o relato de Straume et al.<sup>5</sup>, em uma série de 202 casos de melanomas cutâneos em fase de crescimento vertical, demonstrando que 77% dos casos metastáticos (linfonodais ou à distância) apresentaram ausência da expressão da p16. Bachmann et al.<sup>6</sup> também relataram a associação da perda da expressão da proteína p16 em

melanomas cutâneos com a proliferação celular do tumor e pior prognóstico. Zhang e Rosdahl<sup>15</sup> estudaram a perda da expressão da p16, utilizando a técnica de *Western Blotting*, correlacionando-a com os melanomas cutâneos primários e metastáticos. Esses autores mostraram que a proteína p16 estava fortemente expressa em duas linhas celulares de melanomas primários e fracamente expressa em uma linha celular de melanoma metastático. Fearfield et al.<sup>16</sup> demonstraram que a expressão da proteína p16 estava diminuída em melanomas finos recidivados, em contraste com os tumores que não apresentavam metástases.

Sparrow et al.<sup>17</sup> analisaram a expressão imunohistoquímica de 110 lesões melanocíticas, benignas e malignas. Houve expressão diferencial da proteína p16 entre lesões melanocíticas cutâneas, com perda da expressão associada com o estágio invasivo do desenvolvimento tumoral. A expressão da p16 foi vista em 89% das lesões melanocíticas benignas, em 92% dos melanomas *in situ*, em 50% dos melanomas invasivos primários e 64% dos melanomas metastáticos. Alonso et al.<sup>2</sup> também encontraram, em seu estudo, com 39 diferentes anticorpos diferentes, após analisar 165 amostras de melanoma cutâneo de 88 pacientes, menor expressão da p16 em 89% dos casos com crescimento vertical e em 71% dos casos metastáticos, enquanto que nas lesões benignas a expressão da p16 foi de 100% (9 de 9 casos). Referem, também, que os preditores mais fortes para a sobrevida são a p16 e Bcl-6, e que a probabilidade de morte é oito vezes maior, quando há perda da expressão da p16 ou a Bcl-6 estava positiva.

No presente estudo, os dados demográficos de sexo, idade e localização, correspondem aos encontrados na literatura e aos dados do Instituto Nacional do Câncer - INCA. Com relação ao tipo histológico, observou-se que o melanoma do tipo espalhamento superficial, é o mais freqüente, como esperado, no Estado do Rio Grande do Sul.<sup>1,2,18</sup> A diferença de espessura máxima do tumor (Breslow), entre casos e controles, foi estatisticamente significativa (P=0,003), mostrando que este indicador morfológico constitui-

se um importante fator preditivo de maior agressividade do tumor.<sup>19</sup> Já o nível de Clark não atingiu significância estatística, entre casos e controles (P=0,080).

Embora a técnica do LNS seja padronizada em instituições que se dedicam ao tratamento do melanoma cutâneo, os resultados da pesquisa, muitas vezes, podem não corresponder, exatamente, ao estado clínico do paciente. Rossi et al.<sup>20</sup>, analisando 96 pacientes consecutivos, com LNS positivo e submetidos à linfadenectomia completa, encontraram 20 pacientes (20,8%) com linfonodo não sentinela positivo, o que pode ter um significado clínico importante.

Karim et al.<sup>21</sup>, em junho de 2008, analisando 74 biópsias de LNS, de 33 pacientes, publicaram um estudo em que mostram resultados falso-negativos, em biópsias de LNS, que podem resultar de falhas na medicina nuclear, cirurgia ou patologia. Fizeram uma revisão das linfocintilografias, dados da cirurgia e histopatologia, agregando multimarcadores, pela reação RT-PCR (*real-time quantitative reverse transcription –qRT-polymerase chain reaction*) e medidas de concentração de antimônio (um resíduo do Tecnécio 99m), como marcador do “verdadeiro” *status* do linfonodo sentinela, obtidas por espectroscopia de massa (*inductively coupled plasma mass spectroscopy*), e mostraram que os resultados falso-negativos, num acompanhamento dos pacientes a longo termo, podem ser da ordem de 25%. Por outro lado, Morton et al.<sup>7</sup> comprovaram que existe uma curva de aprendizado do cirurgião com relação à técnica cirúrgica da pesquisa do LNS. Segundo ele, somente após 55 cirurgias o cirurgião começa a ter domínio da técnica.

Como foram utilizadas, neste trabalho, amostras de duas instituições distintas, onde diferentes cirurgiões, com níveis de experiência diferenciados, atuaram na pesquisa do LNS, foram obtidos resultados muito diversos dos da literatura, supondo-se que, por problemas técnicos, não foram estudados casos e controles de forma adequada, uma vez que os linfonodos retirados poderiam ser falso-negativos. Houve significância estatística, mas não

clínica, em relação ao sexo ( $p = 0,01$ ), pois os casos e controles foram obtidos consecutivamente. Acredita-se que este fato se deu ao acaso, pela seleção dos blocos de parafina. Somente o índice de Breslow ( $p = 0,003$ ) mostrou-se, estatística e clinicamente, significativo entre casos e controles, com valor prognóstico. Os resultados da expressão imunohistoquímica da proteína p16, na presente amostra, contrariamente aos estudos da literatura internacional<sup>2-6, 8,15,22</sup>, não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os casos e os controles. A falta de padronização na coleta de material da lesão primária, assim como na determinação do período de tempo máximo entre esse procedimento e a pesquisa do LNS, o encaminhamento de biópsias incisionais, por *shaving* ou por *punch* aos serviços de patologia e a negativa de alguns pacientes em se submeterem à pesquisa do LNS limitaram, bastante, a obtenção de um maior número de peças cirúrgicas para o adequado estadiamento, prejudicando a identificação do fator prognóstico em estudo (ausência de expressão nuclear da proteína p16), em maior número de casos.

A proteína p16 deve ser considerada um importante instrumento para a avaliação do prognóstico do melanoma cutâneo e, associada ao índice de Breslow, pode fornecer uma previsão mais acurada sobre a possibilidade de metástases linfonodais, o que não foi encontrado neste estudo. Ainda, a expressão fraca ou ausente da proteína p16 mais relacionada com os melanomas agressivos e metastáticos, indicaria também aqueles que sofreram disseminação hematogênica, independentemente do LNS ser positivo ou negativo para micrometástases. Para que essa avaliação seja adequada, há necessidade iminente da padronização dos serviços para atender pacientes com melanoma cutâneo, não só no aprimoramento da técnica cirúrgica de pesquisa do LNS, como na forma de obtenção da amostra da lesão primária e estabelecimento de um prazo para pesquisa do LNS, após o diagnóstico do tumor primário.



A correta descrição anatomopatológica é extremamente importante e foi um dos itens melhor relatados nos laudos dos serviços de patologia de onde se originou o material desta pesquisa, incluindo todos os itens sugeridos pelo Grupo Brasileiro de Melanoma (GBM), como: 1. tipo histológico do melanoma; 2. fase de crescimento (radial ou vertical); 3. nível de Clark; 4. profundidade, segundo Breslow; 5. índice mitótico; 6. infiltrado inflamatório linfocitário; 7. Infiltrado inflamatório peritumoral; 8. infiltrado inflamatório intratumoral; 9. invasão vascular linfática e sangüínea; 10. invasão perineural; 11. ulceração; 12. regressão; 13. satelitose microscópica; e 14. margens cirúrgicas. O exame histopatológico do linfonodo sentinela foi delineado para pesquisar metástases, micrometástases (diâmetro menor que 2mm) e/ou grupos de células circulantes no linfonodo, e deve ser considerado um exame protocolar especial. O LNS deve ser completamente examinado, em cortes seriados, de acordo com a metodologia proposta na literatura.<sup>23</sup>

A padronização fotográfica das lesões, a existência de um banco de dados comum a todos os serviços onde os protocolos sejam respondidos na íntegra, o desenvolvimento de métodos moleculares de pesquisa através de técnicas mais complexas como a do *tissue microarray*, entre outras, darão condições para uma pesquisa mais acurada que possa fornecer respostas adequadas ao diagnóstico, prognóstico, tratamento e seguimento apropriado dos pacientes. Desse modo, o perfil epidemiológico do paciente com melanoma cutâneo poderá ser melhor delineado e, conseqüentemente, tratado e acompanhado de acordo com os padrões estabelecidos e utilizado por outras instituições, em todo o mundo.

Finalizando, verificou-se perda de expressão em melanomas cutâneos com metástases e sem metástases em linfonodo sentinela, não se obtendo significância estatística, nos casos analisados. Com a padronização dos protocolos, nas diversas instituições, e do atendimento a pacientes com melanoma cutâneo, associado a estudo complementar da proteína p16 e/ou utilização de outros marcadores tumorais, pode-se auxiliar na detecção de um perfil molecular

prognóstico adequado nos melanomas cutâneos primários, contribuindo para as decisões terapêuticas cirúrgicas e clínicas.

### 3.11 AGRADECIMENTOS E FONTES DE FINANCIAMENTO

**Agradecimentos** aos funcionários do Centro de Pesquisa do HCPA e do Programa de Pós-graduação em Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

**Fonte de financiamento:** Fundação de Incentivo à Pesquisa (FIPE).

### 3.12 REFERÊNCIAS

- 1 Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2004 Feb; 150(2):179-85
- 2 Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L, Acuña MJ, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles. *Am J Pathol* 2004; 164(1):193-203.
- 3 Carlson JA, Ross JS, Slominski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, et al. Molecular diagnostics in melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2005 May; 52(5):743-75.
- 4 Straume O, Smeds J, Kumar R, Hemminki K, Akslen LA. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *Am J Pathol* 2002 July; 161(1):229-37.
- 5 Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res* 2000 May; 6:1845-53.
- 6 Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Altered expression of cell cycle regulators Cyclin D1, p14, p16, CDK4 and Rb in nodular melanomas. *Int J Oncol* 2004; 25:1559-65.
- 7 Morton DL, Wen DR, Wong JM, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992; 127:392-9.

- 8 Chana JS, Grover R, Wilson GD, Sanders R. p16 protein expression in benign and malignant melanocytic lesions. *Melanoma Res* 1997;7(S1):28.
- 9 Chana JS, Grover R, Wilson GD, Hudson DA, Forders M, Sanders R, et al. An analysis of p16 tumor suppressor gene expression in acral lentiginous melanoma. *Brit J of Plast. Surg* 2000; 53, 46-50.
- 10 Mills B. Immunohistochemistry. In: *Laboratory Methods Immunotechnology*, Washington: Ed American Registry of Pathology; 1992. p. 247-55.
- 11 Santos RTM, WA, Kanamura CT, Nanagaki S, Pinto GA. Procedimentos em Imuno-histoquímica e Hibridização “in situ”. In: Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J, editors. *Manual de Imuno-histoquímica*. São Paulo: Reichmann & Affonso; 1999. p. 229-59.
- 12 Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Miettinen M, Peters B, Pross M, et al. High prognostic value of p16<sup>INK4a</sup> alterations in gastrointestinal stromal tumors. *J of Clin Oncology* 2003 May; 21(9):1688-97.
- 13 Clark WH Jr. A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biologic behavior. In: Montagna W, Hu F, editors. *Advances in the Biology of the Skin*. New York: Pergamon, 1967;8:621-47.
- 14 Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*. Nov 1970;172(5):902-8. [Medline].
- 15 Zhang H, Rosdahl I. Deletion in p16<sup>INK4a</sup> and loss of p16 expression in human skin primary and metastatic melanoma cells. *Int J Oncol* 2004;24:331-5.
- 16 Fearfield LA, Larkin JM, Rowe A, A’Hern R, Fisher C, Francis N, et al. Expression of p16, CD95, CD95L and Helix pomatia agglutinin in relapsing and nonrelapsing very thin melanoma. *Br J Dermatol* 2007 Mar; 156(3):440-7.
- 17 Sparrow LE, Eldon MJ, English DR, Heenan PJ. p16 and p21WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *AM J Dermatopathol* 1998 Jun; 20(3):255-61.
- 18 Ministério da Saúde do Brasil – INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>> <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=335](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335)> Acesso: 17.jul.2008.
- 19 Muller MGS, Leeuwen PAM, Lange-de Klerk ESM, Diest PJ, Pijpers R, Ferwerda CC, et al. The sentinel lymph node status is an important factor for predicting clinical outcome in patients with stage I or II cutaneous melanoma. *Cancer* 2001 Jun; 91(12): 2401-8.
- 20 Rossi CR, De Salvo GL, Bonadini E, Mocellin S, Foletto M, Pasquali S, et al. Factors predictive of nonsentinel lymph node involvement and clinical outcome in melanoma patients with metastatic sentinel lymph node. *Ann Surg Oncol* 2008 Apr; 15(4):1202-10.
- 21 Karim RZ, Scolyer RA, Li W, Yee VSK, McKinnon G, Li LL, et al. False negative sentinel lymph node biopsies in melanoma may result from deficiencies in nuclear medicine, surgery, or pathology. *Ann Surg* 2008 Jun; 247(6):1003-10.

- 22 Mihic-Probst D, Mnich CD, Oberholzer PA, Seifert B, Sasse B, Moch H, et al. p16 expression in primary malignant melanoma is associated with prognosis and lymph node status. *Int J Cancer* 2006. May 1;118(9):2262-8.
- 23 Landman G, Muller H, Fillus Neto J, Maceira JMP, Marques M, Costa MB, et al. Consenso para o laudo anatomopatológico do melanoma cutâneo. *Boletim Informativo do GBM*. Ano VI, no. 23 out./nov./dez. 2003. Disponível em: <<http://www.gbm.org.br/GBM/socios.aspx>.> Acesso em: 12.out. 2008.

#### 4 ORIGINAL ARTICLE

### LACK OF ASSOCIATION BETWEEN CUTANEOUS PRIMARY MELANOMA AND p16 PROTEIN EXPRESSION

Fauri JAC<sup>1</sup>; Ricardi F<sup>2</sup>; Diehl ES<sup>3</sup>; Cartell A<sup>4</sup>; Furian R<sup>5</sup>; Bakos L<sup>6</sup>; Edelweiss MIA<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Ms Sc Surgery, Programa de pós graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> MsSc Pathology, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA), Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Ms Sc Clinical Medicine, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup> Assistant Professor, Department of Pathology, Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>5</sup> Assistant Professor, Department of Pathology, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA) and Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>6</sup> Head of Dermatology Service, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>7</sup> Associate Professor, Department of Pathology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

**Please send correspondence to:**

JORGE ANTÔNIO CALEFFI FAURI  
Av. Maryland, 1367 ap. 902  
90440-191 - Porto Alegre, RS. Brazil  
Tel: +55 (51) 3332 0339  
E-mail: fauri47@gmail.com

## 4.1 ABSTRACT

**Background:** Dermal invasion by cutaneous melanoma, measured by maximum tumor thickness or Breslow<sup>1</sup> thickness as well as sentinel lymph node (SLN) biopsy, is important to establish the prognosis and progression of this disease. The use of p16 protein expression as a predictive factor for melanoma evolution and prognosis has been the focus of several studies. Chana found strong expression of p16 protein in melanocytic nevi, low levels of expression in dysplastic melanocytic nevi and progressively lower levels in cutaneous and metastatic melanomas.

**Objective:** To investigate p16 protein expression in cutaneous melanomas with and without SLN metastasis.

**Materials and Methods:** Sixty-seven paraffin-embedded specimens of cutaneous melanomas of patients that had undergone SLN investigation were evaluated from 1995 to 2007. SLN was negative for metastasis in 34 of these patients (controls); in the remaining 33 patients, SLN was positive (cases). Expression of p16 protein in the primary tumor was measured with an immunohistochemical assay. The samples were classified according to their nuclear expression.

**Results:** P16 nuclear expression was absent in 14 (42.4%) cases and in 15 (44.1%) controls;  $p=0.812$ . There was no statistically significant difference in p16 nuclear expression between cases and controls.

**Conclusions:** This study does not confirm that the p16 protein role is important in the prognosis of cutaneous melanoma, despite several studies that have shown that, associated with Breslow thickness, the p16 protein role may provide more accurate information about lymph node status. We, therefore, recommend that diagnostic procedures and treatment protocols for patients with cutaneous melanoma be standardized.

**Keywords:** Cutaneous Melanoma, p16, immunohistochemistry, sentinel lymph node, metastasis

## 4.2 INTRODUCTION

The increase in the incidence of cutaneous melanomas, from 3% to 7% among Caucasians,<sup>1</sup> is a major health concern worldwide. The identification of markers that may accurately predict the chances of a cutaneous melanoma to produce metastases have been the focus of several studies.<sup>2-6</sup> Discoveries in the fields of molecular biology and oncology have provided explanations about several gene associations relative to tumor development.

The sentinel lymph node (SLN) biopsy in cutaneous melanomas, described by Morton et al.,<sup>7</sup> changed surgical approaches in centers that specialize in the treatment of these tumors worldwide. The use of a specific and sensitive histological marker might be helpful in the selection of patients to undergo SLN investigation.

Chana et al.<sup>8</sup> found high p16 expression in melanocytic nevi and lower expression levels in dysplastic melanocytic nevi. Progressively, lower levels were found in primary and metastatic cutaneous melanomas. The same authors<sup>9</sup> studied acral melanomas (lentiginous subtype) and investigated the biological, molecular and cellular basis of these tumors. They suggested that the loss of p16 expression is associated not only with the early transformation of benign lesions but also with disease progression at its invasive stage.

The p16<sup>INK4a</sup> gene was identified as the target of mutations in several types of tumors other than cutaneous melanomas because it encodes the 16kDA protein that inhibits the cyclin-dependent kinase enzymes CDK4 and CDK6. These kinases promote the phosphorylation of Rb protein (retinoblastoma) at the G<sub>1</sub> checkpoint of the cell cycle. The hypophosphorylated form of the Rb protein prevents the progression to the S phase (or synthesis) of the cell cycle as it sequesters a family of transcription factors, such as E2F, necessary for DNA replication and progression of the cell cycle. In the absence of p16

protein, Rb protein undergoes phosphorylation by CDK4 and CDK6; these transcription factors are released and lead to DNA replication and consequent tumor proliferation.<sup>9</sup>

Hypothesis: weak or absent p16 protein expression is associated with poor prognosis in cutaneous malignant melanoma.

In this study, we verified the immunohistochemical p16 protein expression in primary cutaneous melanomas from biopsies prepared for histological analysis. Samples were obtained from patients who, later, underwent sentinel lymph node biopsy according to the protocol of our Division of Oncologic Surgery. The expression of p16 protein was correlated with different histological levels of melanoma progression.

#### 4.3 MATERIALS AND METHODS

This case-control observational study was conducted at Hospital de Clínicas de Porto Alegre and at the Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) in Porto Alegre, Brazil. The factor under study was the immunohistochemical expression of p16 protein in primary cutaneous melanomas. The outcome was the presence or absence of sentinel lymph node (SLN) metastasis.

The independent variables were: sex, age, location of primary tumor, histological type, Breslow thickness and Clark's level.

Inclusion criteria: patients with a diagnosis of cutaneous melanoma surgically treated in the services listed above and who underwent sentinel lymph node biopsy.

Exclusion criteria: previous chemotherapy; history or presence of other concomitant malignant tumor, except skin tumors; immunosuppression; absence or scarcity of material



from primary lesion in paraffin block; incomplete patient records; and distant metastasis of melanoma.

Between 1995 and 2007, 316 cases of primary cutaneous melanoma were selected from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre Anatomical Pathology records. Of those, 163 cases (51.58%) referred only to the primary lesion, without mention of the sentinel lymph node (SLN) investigation, and were excluded from the study. In this group there were 21 *in situ* melanomas, 10 *punch* samples, 2 amelanotic melanomas, 1 multiple melanoma, 1 sample with insufficient material and 1 no classified melanoma. From the remaining 153 (48.42%) cases, 12 referred only to the SLN biopsy, 16 medical records were incomplete, 1 was a mucosal melanoma, 1 recurrent and 56 metastatic melanomas. The other 67 (21.20%) paraffin-embedded specimens of cutaneous melanomas were from patients with complete medical records who underwent SLN investigation during clinical evaluation. Sentinel lymph nodes were negative for metastasis in 34 patients (controls) and positive in 33 (cases).

#### 4.4 IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Representative 3µm thick biopsy sections of the lesion, fixed in formalin and paraffin embedded, were evaluated with the immunohistochemical technique used in the Experimental Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil, as described by Mills<sup>10</sup> in 1992 and Santos et al.<sup>11</sup> in 1999.

The technique includes the following steps: deparaffinization, rehydration, antigen retrieval, endogenous peroxidase inactivation, and blocking of nonspecific reactions. The primary antibody - *monoclonal mouse anti human IgG p16<sup>INK4a</sup>*, DAKO - at 1:50 dilution, is

incubated for 12 hours overnight at 4°C, followed by application of the streptavidin-biotin-peroxidase complex (LSAB, DAKO), development with diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB kit, DAKO) and counterstained with Giemsa.

For detection of p16 protein in this study, a stained slide with a high-degree intraepithelial lesion of the uterine cervix was used as a positive control, and a slide without the primary antibody was used as a negative control. Non-neoplastic stromal cells, with nuclear reactivity and lymphocytes, were used as internal positive control.

Giemsa staining was used to neutralize and differentiate actual staining from the immunohistochemical technique (brownish because of DAB) with the melanotic brownish color of the lesion, which became markedly bluish after counterstaining.

Two pathologists blinded to histological and clinical data read and classified the intensity of p16 oncoprotein on the slides. The final results were obtained by consensus between the two pathologists.

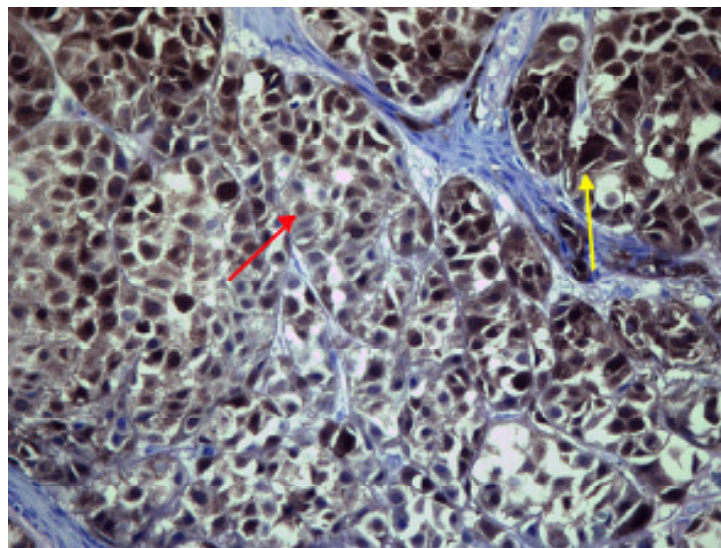
#### 4.5 p16<sup>INK4a</sup> INTERPRETATION

The intensity of nuclear expression of p16 protein was classified into four levels: absent, weak, moderate and strong. After evaluation of 10 high-powered fields, each field was defined as 400X magnification, as suggested by Schneider-Stock et al.<sup>12</sup> A section was classified as immunohistochemically positive for p16 when the nucleus of the tumor cells was stained, with or without cytoplasmic expression, and was graded using a semi-quantitative 0-to-3 point scale (Table 1).

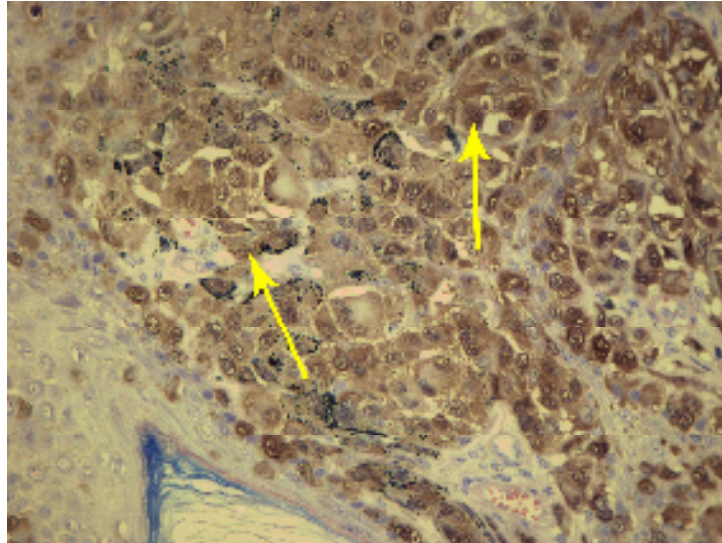
**Table 1.** Semi-quantitative scale of nuclear staining, according to Schneider-Stock et al.<sup>12</sup>

Nuclear expression	Percentage of stained nuclei	Point scale
Absent	0 to 5%	0
Weak	6 to 20%	1
Moderate	21 to 50%	2
Strong	Over 50%	3

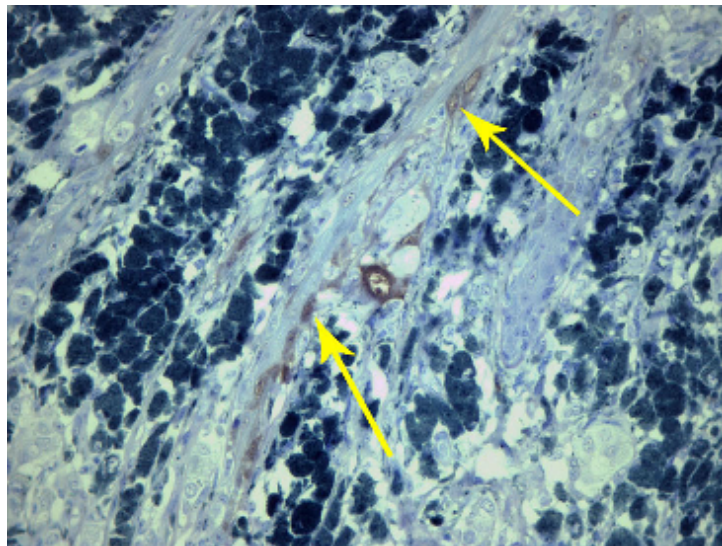
Figures 1 to 4 show images of nuclear expression reactions in study cases and are examples of the criteria used for their classification.



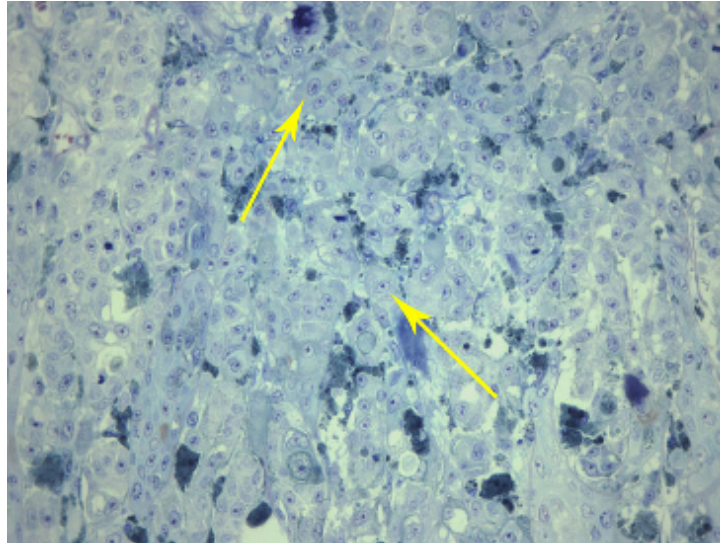
**Figure 1. Strong expression.** Digital image of cutaneous melanoma with strong (yellow arrow) and moderate (red arrow) nuclear expression of p16 protein. See weak cytoplasmic staining, not evaluated in the study (p16, immunohistochemistry, 400x magnification in original).



**Figure 2. Moderate expression.** Digital image of cutaneous melanoma showing moderate expression of p16 protein (yellow arrow) in some nuclei. (p16, immunohistochemistry, 400x magnification in original).



**Figure 3. Weak expression.** Digital image of cutaneous melanoma with weak nuclear expression of p16 protein. Areas with nuclei that are not intensely stained (yellow arrows) (p.16, immunohistochemical staining, 400x magnification in original).



**Figure 4. No expression.** Digital image of cutaneous melanoma with no nuclear expression of p16 protein. Blue areas show melanin reaction (yellow arrow) and Giemsa counterstaining (p16 immunohistochemical staining, 400x magnification in original).

#### 4.6 HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS

The morphological analysis of slides was made by two pathologists. The pathological results of cases and controls were classified and analyzed according to several subtypes of cutaneous melanoma, based on the histogenetic classification described by Clark: acral, superficial spreading, nodular and lentigo maligna melanoma.<sup>13</sup> Histological criteria of lesion progression – Clark's<sup>13</sup> level and Breslow<sup>14</sup> thickness – were also reviewed.

All cases were evaluated clinically and histologically for the presence or absence of metastasis in the sentinel lymph node by reviewing results of histological exams.

#### 4.7 STATISTICAL ANALYSIS

The SPSS for Windows® 13.0 software was used for data analysis. Descriptive analysis was expressed as absolute and relative frequencies. Pearson's chi-square test, Fisher's exact test and Student's *t* test were used to compare demographic, clinical and histological data between cases and controls. The level of significance was set at 0.05.

Sample calculation: Considering that in positive SLN the p16 mean expression is, approximately, 1.5 with a standard deviation (SD)  $\pm 1$ , and that in negative SLN the p16 mean expression is, approximately, 2.3 with SD $\pm 1$ , we calculated the sample size in 60 cases, considering a confidence interval of 95% and a power of 80%.

Maximum lesion micro-thickness according to Breslow<sup>14</sup> thickness was correlated with greater or lower expression of p16 using the Pearson's correlation coefficient (*r*). Likewise, histological types and tumor locations were compared with levels of expression.

#### 4.8 ETHICAL ISSUES

Permission to use all the biological material in this study was granted by the Ethics Committees of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, protocol no. 06/072, and of Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, according to the consolidated opinion issued under no. 316/07. The material was collected from patients whose biopsies were made by the surgery and dermatology team of the two hospitals and stored in paraffin blocks in the two surgical pathology departments.

## 4.9 RESULTS

Thirty-three cases with SLN metastasis and 34 controls without SLN metastasis were studied. Thirteen (39.4%) of the cases were female patients and 20 (60.6%), male. Twenty five (73.5%) of the controls were female patients and 9 (26.5%), male ( $p=0.010$ ). Mean age of patients with positive SLN (cases) was  $54 \pm 14$  years. Mean age of patients with negative SLN (controls) was  $53 \pm 13$  years ( $p=0.662$ ). The most frequent anatomic tumor site was the back: 10 (30.3%) cases and 8 (25.8%) controls ( $p=0.156$ ) (Table 2).

**Table 2:** Demographic characteristics of the study population with cutaneous melanoma (n=67)

Variable	Category	Case (n=33)	Control (n=34)	p-value
Sex	Female	13 (39.4)	25 (73.5)	0.010*
	Male	20 (60.6)	9 (26.5)	
Age		$54 \pm 14$	$53 \pm 13$	0.662***
Site	Back	10 (30.3)	8 (25.8)	0.156**
	Foot	7 (21.2)	4 (12.9)	
	Lower extremity, except foot	5 (15.2)	8 (25.8)	
	Scalp/neck	3 (9.1)	0 (0)	
	Thorax	3 (9.1)	0 (0)	
	Upper extremities	2 (6.1)	7 (22.6)	
	Face	2 (6.1)	2 (6.5)	
	Abdomen	1 (3)	2 (6.5)	

Note: \* Chi square test. Values expressed as absolute (relative) frequencies.

\*\* Fisher's exact test. Values expressed as absolute (relative) frequencies.

\*\*\* Student's *t* test. Values expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

The predominant histological tumor type was superficial spreading melanoma: 22 (66.7%) cases and 25 (78.1%) controls (Table 3).

**Table 3.** Distribution of frequencies according to histological type of cutaneous melanoma

Subtype	n	SLN+ (Cases)	SLN- (Controls)	p-value
Superficial spreading	47	22 (66.7)	25 (73.5)	0.653**
Acral	10	6 (18.2)	4 (11.8)	
Nodular	6	4 (12.1)	2 (5.9)	
Lentigo maligna melanoma	1	0 (0)	1 (2.9)	
Not classified	3	1 (3)	2 (5.9)	
Total	67	33	34	

Note: \*\* Fisher's exact test. Values expressed as absolute (relative) frequencies.

SLN+: Positive sentinel lymph node; SLN-: Negative sentinel lymph node; n = no. of patients.

The classification according to Breslow thickness showed that most tumors had a thickness ranging from 1.01 to 4.00 mm: 20 (60.6%) cases and 21 (61.8%) controls (p=0.003). Most tumors were classified as Clark's Levels III or IV. Clark's Level III: 4 (12.1%) cases and 10 (29.4%) controls. Clark's Level IV: 23 (69.7%) cases and 23 (67.6%) controls (p=0.080) (Table 4).

**Table 4.** Tumor thickness (Breslow) and Clark's levels of cutaneous melanomas in cases and controls

Variable	Category	Case (n=33)	Control (n=34)	P-value
Breslow	Up to 0.75	1 (3)	5 (14.7)	0.003**
	0.76 to 1.00	2 (6.1)	7 (20.6)	
	1.01 to 4.00	20 (60.6)	21 (61.8)	
	4.01 or over	10 (30.3)	1 (2.9)	
Clark	2	1 (3)	0 (0)	0.080**
	3	4 (12.1)	10 (29.4)	
	4	23 (69.7)	23 (67.6)	
	5	5 (15.2)	1 (2.9)	

Note: \*\* Fisher's exact test. Values expressed as absolute (relative) frequencies.



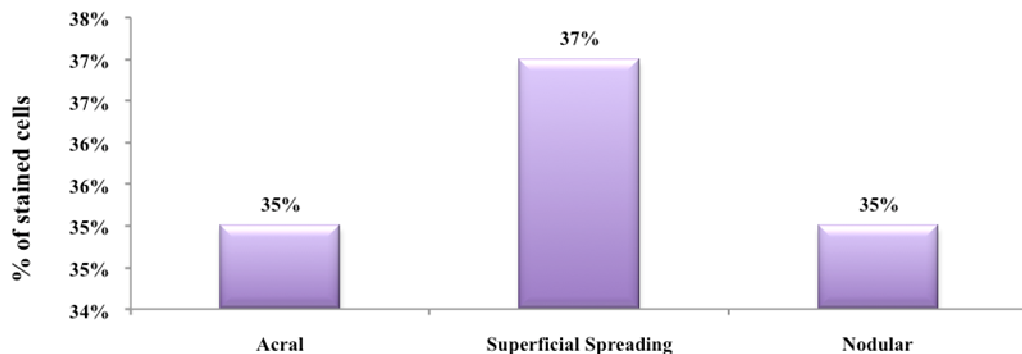
The analysis of intensity of p16 protein expression<sup>12</sup> revealed that it was absent in 14 (42.4%) cases and 15 (44.1%) controls; it was weak in 3 (9.1%) cases and in 3 (8.8%) controls, OR: 1.07 (95%CI, 0.14-8.34); moderate in 3 (9.1%) cases and 1 (2.9%) control, OR: 3.21 (95%CI, 0.24-90.82); strong in 13 (39.4%) cases and in 15 (44.1%) controls, OR: 0.93 (95%CI, 0.29-2.99) (p=0.812) (Table 5).

**Table 5.** P16 expression according to expression intensity in cases and controls<sup>12</sup>

Variable	Category	Case (n=33)	Control (n=34)	P-value	OR (95%CI)
Expression	Absent	14 (42.4)	15 (44.1)	0.812**	1
	Weak	3 (9.1)	3 (8.8)		1.07 (0.14 – 8.34)
	Moderate	3 (9.1)	1 (2.9)		3.21 (0.24 – 90.82)
	Strong	13 (39.4)	15 (44.1)		0.93 (0.29 – 2.99)

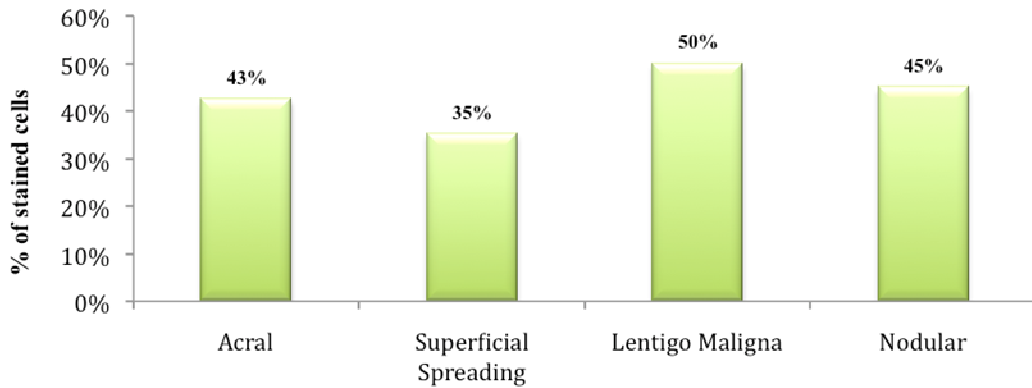
Note: \*\* Fisher's exact test. Values expressed as absolute (relative) frequencies.

A comparison of p16 protein expression (percentage of stained nuclei) with the histological tumor type in the cases revealed the following values for mean percentage of stained nuclei: acral melanoma, 35% (SD±0.40); superficial spreading melanoma, 37% (SD±0.39); and nodular, 35% (SD±0.34) (Graph 1).



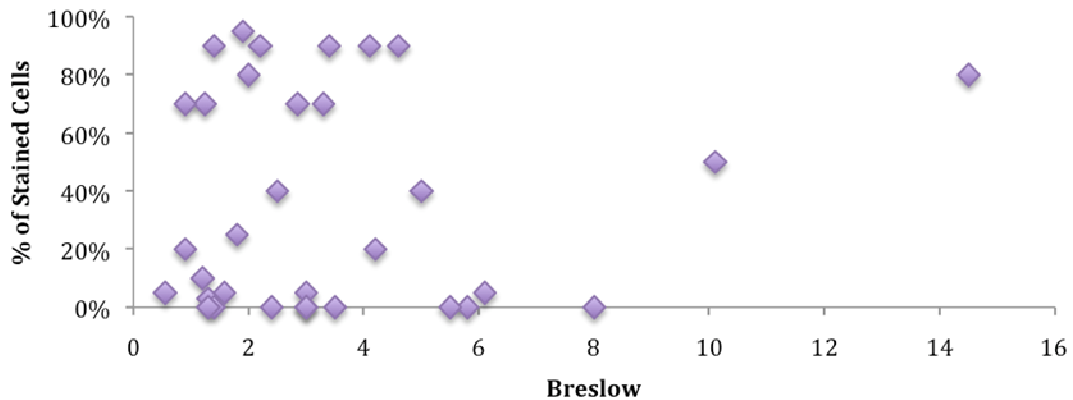
**Graph 1.** Mean percentage of stained nuclei according to histological tumor type in cases

A comparison of p16 protein expression (percentage of stained nuclei) with the histological tumor type in the controls revealed the following values for mean percentage of stained nuclei: acral melanoma 43% (SD± 0.38); superficial spreading, 35% (SD± 0.40); lentigo maligna melanoma, 50%; and nodular, 45% (SD± 0.49) (Graph 2).



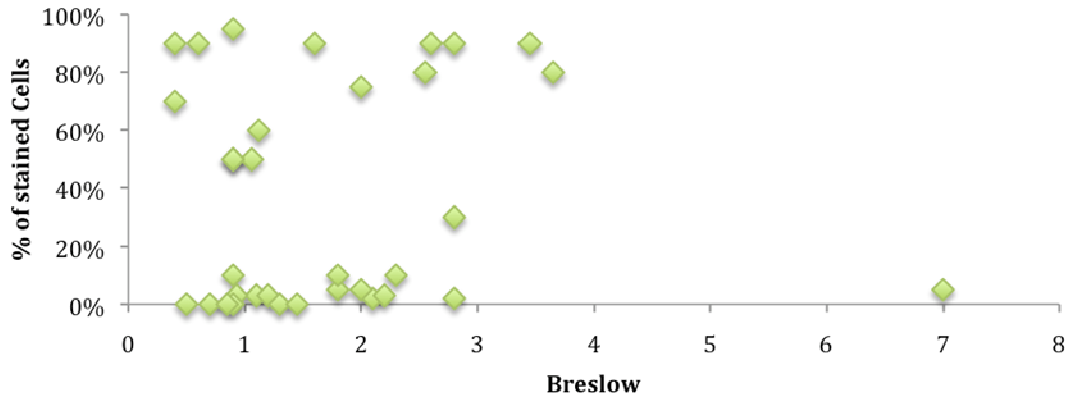
**Graph 2.** Mean percentage of stained nuclei according to histological tumor type in controls

A comparison of maximum tumor thickness (Breslow thickness) with the percentage of stained nuclei in cases (expression) did not reveal any correlation between Breslow thickness and positive p16 protein results (percentage of stained nuclei)  $r = 0.029$ ;  $p = 0.873$  (Graph 3).



**Graph 3.** Distribution of stained nuclei (%) in relation to tumor thickness in cases

A comparison of maximum tumor thickness (Breslow thickness) with the percentage of stained nuclei in controls (expression) did not reveal any correlation between Breslow thickness and positive p16 protein results (percentage of stained nuclei)  $r = 0.146$ ;  $p = 0.410$  (Graph 4).



**Graph 4.** Distribution of stained nuclei (%) in relation to tumor thickness in controls.

#### 4.10 DISCUSSION

In this study we verified the expression of p16 protein in primary cutaneous melanomas with and without sentinel lymph node (SLN) metastasis.

Several studies of cutaneous melanoma analyzed the use of p16 protein (cyclin-dependent kinase-inhibitor –CDK4 and CDK6 – cyclin D, which inhibits retinoblastoma – Rb protein).<sup>2-6</sup>

Some important findings were reported by Straume et al.<sup>5</sup> who conducted a study with 202 cases of cutaneous melanomas in the vertical growth phase and found that 77% of the metastatic cases (lymph nodes or distant) did not express p16. Bachmann et al.<sup>6</sup> also found an

association with the loss of p16 expression in cutaneous melanomas with tumor cell proliferation and poor prognosis. Zhang and Rosdahl<sup>15</sup> studied the loss of p16 expression using the Western blot technique and correlated it with primary and metastatic cutaneous melanomas. They showed that p16 protein was strongly expressed in two cell lines of primary melanomas and weakly expressed in a cell line of metastatic melanomas. Fearfield et al.<sup>16</sup> found that the expression of p16 protein was lower in recurrent thin melanomas than in tumors without metastases.

Sparrow et al.<sup>17</sup> analyzed the immunohistochemical expression of 110 benign and malignant melanocytic lesions. The expression of p16 protein was different in cutaneous melanocytic lesions, and loss of expression was associated with the invasive stage of tumor growth. The expression of p16 was found in 89% of benign melanocytic lesions, in 92% of *in situ* melanomas, in 50% of primary invasive melanomas, and in 64% of metastatic melanomas. Alonso et al.<sup>2</sup> studied 39 different antibodies and, after analyzing 165 samples of cutaneous melanomas from 88 patients, also found a lower expression of p16 in 89% of the cases with vertical growth and in 71% of metastatic cases, whereas p16 expression in benign lesions was 100% (9 of 9 cases). They also reported that the best predictors of survival are p16 and Bcl-6, and that the risk of death is eight times greater when there is loss of p16 expression or when Bcl-6 is positive.

In our study, demographic data about sex, age and location were similar to those reported in the literature and by the Brazilian Cancer Institute (INCA). The analysis of histological types revealed that the superficial spreading type was the most frequent, as expected, in the State of Rio Grande do Sul.<sup>1,2,18</sup> The difference in maximum tumor thickness (Breslow) between cases and controls was statistically significant ( $p=0.003$ ), which showed that this morphological marker is an important predictive factor of tumor

aggressiveness.<sup>19</sup> The differences in Clark's levels, however, were not statistically significant between cases and controls ( $p=0.080$ ).

Although SLN biopsy is a standard procedure in institutions that treat cutaneous melanomas, research results often do not correspond to the exact clinical condition of the patient. Rossi et al.<sup>20</sup> examined 96 consecutive patients with positive SLN who underwent complete lymphadenectomy and found 20 patients (20.8%) with positive non-sentinel lymph nodes, which may be clinically significant.

In June 2008, Karim et al.<sup>21</sup> examined 74 SLN biopsies from 33 patients and published a study that reported false negative results in SLN biopsies, which may result from failures in nuclear medicine, surgery or pathology. They reviewed lymphoscintigraphies, surgery data, and histological findings and aggregated multimarkers using real-time quantitative reverse transcription – qRT-polymerase chain reaction (RT-PCR) and antimony (a residue of technetium 99m) concentration measurements, as markers of the “true” status of the sentinel lymph node obtained with the use of inductively coupled plasma mass spectroscopy, and found that false negative results may represent 25% of the cases in long-term follow-up. Yet, Morton et al.<sup>7</sup> confirmed the existence of a learning curve for the surgical technique to evaluate SLN. According to their results, only after 55 surgeries does the surgeon begin to master the use of this technique.

Our study used samples from two institutions where different surgeons with different levels of expertise performed SLN biopsies. Our results differed greatly from those found in the literature. Technical problems may have resulted from the fact that cases and controls were not adequately studied, as the lymph nodes removed might have yielded false negative results. There was statistical, but not clinical, significance in sex differences ( $p=0.01$ ) because cases and controls were enrolled consecutively. This is believed to have occurred by chance due to the selection of paraffin blocks. Only the differences in Breslow thickness ( $p=0.003$ )

were statistically and clinically significant between cases and controls, and had a prognostic value. The results of immunohistochemical expression of p16 protein in our study sample, contrary to studies in the international literature,<sup>2-6,8,15,22</sup> did not show statistically significant differences between cases and controls. The lack of standard procedures to collect material from the primary lesion, as well as to determine the maximum time between this procedure and SLN biopsy, may explain the inconsistencies. Incisional or punch biopsies sent to the pathology services, together with the refusal of some patients to undergo SLN biopsy, may have complicated the collection of a larger number of surgical specimens for correct staging, limiting the identification of the prognostic factor under study – the absence of p16 protein nuclear expression – in a larger number of cases.

P16 protein should be regarded as an important tool in the prognosis of cutaneous melanoma. Together with Breslow thickness, it may provide a more accurate prediction of lymph node metastases, but this was not confirmed in our study. Yet, weak or absent p16 protein expression related to more aggressive or metastatic melanomas may show those with hematic dissemination no matter the lymph node status for micro metastasis (positive or negative). For an adequate evaluation, services should follow standard procedures to treat patients with cutaneous melanoma to improve not only the SLN biopsy techniques but also the collection of primary lesion samples, and to establish a time frame for SLN biopsy after the diagnosis of the primary tumor.

The correct histological description of specimens is extremely important and was one of the best described items provided by the pathology services where the material for this study was obtained. The description included all the items suggested by the Brazilian Melanoma Group (GBM), such as: 1. Histological type of melanoma; 2. Growth phase (radial or vertical); 3. Clark's level; 4. Depth according to Breslow; 5. Mitotic index; 6. Inflammatory lymphocyte infiltrate; 7. Peritumoral inflammatory infiltrate; 8. Intratumoral

inflammatory infiltrate; 9. Lymphatic and blood vessel invasion; 10. Perineural invasion; 11. Ulceration; 12. Regression; 13. Microscopic satellitosis; and 14. Surgical margins. Histological examination of sentinel lymph node was designed to investigate metastasis, micro-metastases (diameter smaller than 2 mm) or groups of cells circulating in the lymph node, and should be regarded as a special protocol. SLN should be fully examined in serial sections according to the methods suggested in the literature.<sup>23</sup>

The photographic standardization of lesions, the existence of a database common to all the services where all protocol items are entered, the development of molecular methods of investigation by means of more complex techniques, such as tissue microarray, will provide conditions for more accurate studies and responses to patient diagnosis, prognosis, treatment and follow-up. Therefore, the epidemiological profile of patients with cutaneous melanoma should be better outlined so that those patients will, as a result, be treated and followed up according to established standards used by international institutions.

Finally, this study found a loss of p16 expression in cutaneous melanomas both with and without sentinel lymph nodes metastasis without statistical significance. The standardization of protocols in different institutions and of the care provided to patients with cutaneous melanoma, associated with complementary studies of p16 protein or other tumor markers and proteomics studies, may help to outline a prognostic molecular profile for primary cutaneous melanomas, which may eventually support surgical and clinical decisions.

#### 4.11 ACKNOWLEDGEMENTS AND SOURCE OF FUNDING

We thank the staff at the Research Center of HCPA and at the Graduate Program in Surgical Sciences of the Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

**Source of funding:** Fundação de Incentivo a Pesquisa (FIPE – Research Incentive Foundation) at HCPA.

#### 4.12 REFERENCES

- 1 Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2004 Feb; 150(2):179-85
- 2 Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L, Acuña MJ, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles. *Am J Pathol* 2004; 164(1):193-203.
- 3 Carlson JA, Ross JS, Slominski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, et al. Molecular diagnostics in melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2005 May; 52(5):743-75.
- 4 Straume O, Smeds J, Kumar R, Hemminki K, Akslen LA. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *Am J Pathol* 2002 July; 161(1):229-37.
- 5 Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res* 2000 May; 6:1845-53.
- 6 Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Altered expression of cell cycle regulators Cyclin D1, p14, p16, CDK4 and Rb in nodular melanomas. *Int J Oncol* 2004; 25:1559-65.
- 7 Morton DL, Wen DR, Wong JM, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992; 127:392-9.
- 8 Chana JS, Grover R, Wilson GD, Sanders R. p16 protein expression in benign and malignant melanocytic lesions. *Melanoma Res* 1997; 7(S1):28.
- 9 Chana JS, Grover R, Wilson GD, Hudson DA, Forders M, Sanders R, et al. An analysis of p16 tumor suppressor gene expression in acral lentiginous melanoma. *Brit J of Plast. Surg* 2000; 53, 46-50.
- 10 Mills B. Immunohistochemistry. In: *Laboratory Methods Immunotechnology*, Washington: Ed American Registry of Pathology; 1992. p. 247-55.
- 11 Santos RTM, WA, Kanamura CT, Nanagaki S, Pinto GA. Procedimentos em Imuno-histoquímica e Hibridização “in situ”. In: Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J, editors. *Manual de Imuno-histoquímica*. São Paulo: Reichmann & Affonso; 1999. p. 229-59.



- 12 Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Miettinen M, Peters B, Pross M, et al. High prognostic value of p16<sup>INK4a</sup> alterations in gastrointestinal stromal tumors. *J of Clin Oncology* 2003 May; 21(9):1688-97.
- 13 Clark WH Jr. A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biologic behavior. In: Montagna W, Hu F, editors. *Advances in the Biology of the Skin*. New York: Pergamon, 1967;8:621-47.
- 14 Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*. Nov 1970;172(5):902-8. [Medline].
- 15 Zhang H, Rosdahl I. Deletion in p16<sup>INK4a</sup> and loss of p16 expression in human skin primary and metastatic melanoma cells. *Int J Oncol* 2004;24:331-5.
- 16 Fearfield LA, Larkin JM, Rowe A, A'Hern R, Fisher C, Francis N, et al. Expression of p16, CD95, CD95L and Helix pomatia agglutinin in relapsing and nonrelapsing very thin melanoma. *Br J Dermatol* 2007 Mar; 156(3):440-7.
- 17 Sparrow LE, Eldon MJ, English DR, Heenan PJ. p16 and p21WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *AM J Dermatopathol* 1998 Jun; 20(3):255-61.
- 18 Ministério da Saúde do Brasil – INCA – Instituto Nacional do Câncer. Available at: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>> <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=335](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335)> Accessed on July 17, 2008.
- 19 Muller MGS, Leeuwen PAM, Lange-de Klerk ESM, Diest PJ, Pijpers R, Ferwerda CC, et al. The sentinel lymph node status is an important factor for predicting clinical outcome in patients with stage I or II cutaneous melanoma. *Cancer* 2001 Jun; 91(12): 2401-8.
- 20 Rossi CR, De Salvo GL, Bonadini E, Mocellin S, Foletto M, Pasquali S, et al. Factors predictive of nonsentinel lymph node involvement and clinical outcome in melanoma patients with metastatic sentinel lymph node. *Ann Surg Oncol* 2008 Apr; 15(4):1202-10.
- 21 Karim RZ, Scolyer RA, Li W, Yee VSK, McKinnon G, Li LL, et al. False negative sentinel lymph node biopsies in melanoma may result from deficiencies in nuclear medicine, surgery, or pathology. *Ann Surg* 2008 Jun; 247(6):1003-10.
- 22 Mihic-Probst D, Mnich CD, Oberholzer PA, Seifert B, Sasse B, Moch H, et al. p16 expression in primary malignant melanoma is associated with prognosis and lymph node status. *Int J Cancer* 2006. May 1;118(9):2262-8.
- 23 Landman G, Muller H, Fillus Neto J, Maceira JMP, Marques M, Costa MB, et al. Consenso para o laudo anatomopatológico do melanoma cutâneo. *Boletim Informativo do GBM*. Ano VI, no. 23 out./nov./dez. 2003. Available at: <<http://www.gbm.org.br/GBM/socios.aspx>> Accessed on October 12, 2008.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)